

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:

BIOLOGIE

Studijní obor:

GENETIKA, MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A VIROLOGIE



**Bc. Štěpánka Vlachová**

Role histon deacetylázy 6 v replikačním cyklu myšího polyomaviru

The role of histone deacetylase 6 in murine polyomavirus replication cycle

Diplomová práce

Školitelka: RNDr. Lenka Horníková, Ph.D.

Praha, 2021



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 20.04.2021

Podpis:

Tato práce vznikla v letech 2018 - 2021 a byla finančně podpořena finančním darem *Ligy proti rakovině Praha*.

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce RNDr. Lence Horníkové, Ph.D. za její ochotu, trpělivost a pomoc při sepisování této diplomové práce, ale i za dlouholeté vedení, nezměrné množství cenných rad a pečlivé seznámení s prací v laboratoři, které mi během 5 let mého působení v Laboratoři molekulární virologie poskytla. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře molekulární virologie za příjemné a přátelské pracovní prostředí. V neposlední řadě pak díky patří mým rodičům a sestře za neutuchající podporu při studiu.

## **Abstrakt:**

Replikační cyklus polyomavirů je stejně jako u ostatních virů zcela závislý na hostitelských buňkách. Pro viry je důležitý nejen buněčný replikační a translační aparát, ale virovou infekci ovlivňují také další buněčné proteiny. Tato práce se zabývá rolí hlavní cytoplazmatické deacetylázy histon deacetylázy 6 (HDAC6) v replikačním cyklu myšího polyomaviru (MPyV). Podařilo se nám prokázat, že přítomnost plně funkční HDAC6 je nezbytná pro úspěšnou a produktivní infekci. Zjistili jsme, že HDAC6 ovlivňuje jak časnou, tak i pozdní fázi infekce. Při inhibici, či úplně absenci tohoto proteinu v buňkách je MPyV infikuje s menší efektivitou a zároveň při infekci vzniká méně infekčního virového potomstva. Naopak při využití buněk s částečně funkční HDAC6 schopnou buď deacetylace či vazby ubiquitinu se schopnost MPyV infikovat tyto buňky zvyšuje. Analýzou hladin časného LT antigenu a pozdního strukturního proteinu VP1 jsme prokázali, že HDAC6 ovlivňuje jejich hladiny v infikovaných buňkách. Naše data také naznačují, že v replikačním cyklu MPyV je vyžadována přítomnost především ubiquitin-vazebné domény HDAC6 a s ní spojená funkce v metabolismu a degradaci virových a buněčných proteinů.

V druhé části diplomového projektu jsme se zaměřili na přípravu expresních plazmidů nesoucích časnou genovou oblast kódující tumorogenní antigeny myšího polyomaviru a lidského BK polyomaviru. Také se nám podařilo připravit linii lidských ledvinných buněk RPTEC/hTERT1 s delecí HDAC6 pomocí systému CRISPR/Cas9. Po detailnější charakterizaci pak tato linie může společně s expresními plazmidy sloužit ke studiu role HDAC6 v nádorové transformaci indukované polyomaviry.

**Klíčová slova:** histon deacetyláza 6, HDAC6, polyomavirus, replikační cyklus, virové proteiny, deacetylace

**Abstract:**

The replication cycle of polyomaviruses is, consistently with other viruses, fully dependent on host cells. Not only the cellular replicational and translational mechanisms are important for viruses, but also the virus infection is affected by other cellular proteins. This work is focused on the role of major cytoplasmic deacetylase, histone deacetylase 6 (HDAC6) in replication cycle of murine polyomavirus (MPyV). We showed that the presence of fully functional HDAC6 is essential for successful and productive infection. We found that HDAC6 affects not only early phase, but also late phase of infection. Cells with inhibited, or absent HDAC6 are infected with decreased effectivity and moreover lower amount of infectious viral particles is produced. On the other side, using cells with partially functional HDAC6, either in its deacetylase activity or in ubiquitin-binding activity, leads to increased ability of MPyV to infect those cells. Analysis of levels of early LT antigen and late structural protein VP1 in the infected cells showed, that viral proteins are affected by HDAC6. Our data suggest, that in the replication cycle of MPyV mainly the ubiquitin-binding domain of HDAC6 is required and the role of this domain in protein metabolism and degradation.

In the second part of diploma project, we constructed expression plasmids carrying early region of murine polyomavirus and human BK polyomavirus, where the tumorigenic antigens are coded. Furthermore, by using CRISPR/Cas9 system we managed to prepare line of human retinal cells RPTEC/hTERT1 with HDAC6 knockout. The detailed characterisation of this cell line is required. After it is done, our cell line and plasmid constructs can be used for research on the role of HDAC6 in polyomavirus induced cell transformation.

**Key words:** histone deacetylase 6, HDAC6, polyomavirus, replication cycle, viral proteins, deacetylation

## Seznam zkratek:

APS = amonium persulfát

BKPyV = BK polyomavirus

bp = páry nukleotidových bazí

CsCl = chlorid cesný

DAPI = 4', 6 – diamidino - 2 - fenyindol dihydrochlorid

DMEM = Eagelovo médium modifikované Dulbeccem

DNA = deoxyribonukleová kyselina

dsDNA = dvouvláknová molekula DNA

*E. coli* = *Escherichia coli*

EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová

FBS = fetální bovinní sérum

GAPDH = glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenáza

HCl = kyselina chlorovodíková

HDAC6 = histon deacetyláza 6

HIV = virus imunitní nedostatečnosti

hpi = hodiny po infekci

IAV = virus influenzy typu A

JCPyV = JC polyomavirus

kbp = tisíc párů nukleotidových bazí

kDa = tisíc Daltonů

LB médium = Luria-Bertrani médium

LT = velký tumorogenní antigen

M = marker molekulových hmotností

MCPyV = polyomavirus karcinomu Merkelových buněk

MgSO<sub>4</sub> = síran hořečnatý

ml = mililitr

MPyV = myší polyomavirus

mRNA = z anglického messenger RNA, česky také mediátorová RNA

MT = střední tumorogenní antigen

NaCl = chlorid sodný

NaK = chlorid draselný

N'/C' = amino/karboxy konec

NLS = jaderný lokalizační signál

NES = jaderný exportní signál

nm = nanometr

PAGE = polyakrylamidová gelová elektroforéza

PBS = fosfátový pufr

PCR = polymerázová řetězová reakce

pre-mRNA = prekurzorová mediátorová RNA

RNA = ribonukleová kyselina

rpm = otáčky za minutu

SDS = dodecylsulfát sodný

ST = malý tumorogenní antigen

SV40 = simian vacuolating virus 40

Tris = tris(hydroxymethyl) aminomethan



VP1 = Virový protein 1

VP2 = Virový protein 2

VP3 = Virový protein 3

Vif = virový infekční faktor HIV

WUPyV = WU polyomavirus

$\mu\text{g}$  = mikrogram

$\mu\text{l}$  = mikrolitr

$\mu\text{M}$  = mikromolární

$^{\circ}\text{C}$  = stupeň Celsia

## Obsah

1	Úvod:.....	1
2	Literární přehled: .....	2
2.1	Viry čeledi <i>Polyomaviridae</i> .....	2
2.1.1	Organizace genomu.....	3
2.1.2	Virová kapsida .....	6
2.1.3	Replikační cyklus.....	6
2.1.3.1	Význam mikrotubulů v replikačním cyklu polyomavirů.....	9
2.1.4	Tumorigenní antigeny a jejich onkogenní potenciál .....	10
2.2	Histon deacetyláza 6.....	14
2.2.1	Katalytické funkce .....	15
2.2.2	Ubiquitin-vazebné funkce .....	16
2.2.3	Role HDAC6 v onkogenezi a virové infekci .....	18
3	Cíle práce:.....	20
4	Materiály a metody:.....	21
4.1	Média pro buněčné linie:.....	21
4.2	Bakteriální média .....	21
4.3	Pufry:.....	21
4.4	Buněčné linie: .....	22
4.5	Viry:.....	23
4.6	Bakteriální kmeny .....	23
4.7	Antibiotika (výsledné koncentrace v médiu):.....	23
4.8	Inhibitory: .....	23
4.9	Enzymy:.....	23
4.10	Protilátky:.....	24
4.11	Markery molekulových vah a barviva:.....	24

4.12	Primery: .....	25
4.13	Plazmidy:.....	25
4.14	Transfekční činidla .....	26
4.15	Komerční soupravy: .....	26
4.16	Práce s viry:.....	26
4.16.1	Izolace viru MPyV .....	26
4.16.2	Přečištění viru v CsCl gradientu .....	27
4.16.3	Stanovení virového titru.....	28
4.16.4	Hemaglutinační test .....	28
4.17	Práce s tkáňovými kulturami .....	29
4.17.1	Pasážování buněk linie 3T6, 3T3 a 293.....	29
4.17.2	Stanovení počtu buněk pomocí Bürkerovy komůrky .....	29
4.17.3	Kultivace myších fibroblastů na mikroskopických sklech.....	30
4.17.4	Ošetření buněk 3T6 tubacinem.....	30
4.17.5	Infekce buněčných linií 3T3 a 3T6 .....	31
4.17.6	Pasážování lidských ledvinných buněk RPTEC/hTERT1 .....	31
4.17.7	Stanovení efektivní inhibiční koncentrace tubacinu .....	32
4.17.8	Stanovení citlivosti buněk RPTEC/hTERT1 na puromycin .....	32
4.17.9	Optimalizace transfekce buněk RPTEC/hTERT1 transfekčním činidlem UltraCruz Transfection Reagent .....	32
4.17.10	Delece genu HDAC6 z buněk RPTEC/hTERT1 systémem CRISPR/Cas9.....	33
4.17.11	Transfekce buněk 293.....	34
4.18	Práce s proteiny .....	34
4.18.1	Příprava buněčných lyzátů .....	34
4.18.2	Příprava vzorků na SDS proteinovou elektroforézu .....	34
4.18.3	SDS – proteinová elektroforéza.....	35

4.18.4	WESTERN blot.....	35
4.18.5	Imunodetekce proteinů na membráně.....	36
4.18.6	Nepřímá imunofluorescence.....	36
4.19	Práce s bakteriemi .....	37
4.19.1	Kultivace bakterií v tekutém médiu .....	37
4.19.2	Kultivace bakterií na pevném médiu.....	37
4.19.3	Příprava bakteriálních konzerv.....	37
4.19.4	Izolace plazmidové DNA – GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)	38
4.19.5	Měření koncentrace izolované DNA .....	38
4.19.6	Sekvenace.....	38
4.19.7	DNA elektroforéza .....	38
4.19.8	Restrikční štěpení DNA.....	39
4.19.9	Srážení DNA.....	39
4.19.10	Re-cirkualizace plazmidu T4 DNA ligázou .....	39
4.19.11	Polymerázová řetězová (PCR).....	40
4.19.12	Plazmid pEF1-MPyV-early.....	40
4.19.13	Plazmid pEF1-BKPyV-early.....	40
4.19.14	TOPO klonování (příprava donorového vektoru) .....	41
4.19.15	Transformace bakterií tepelným šokem.....	41
4.19.16	Minipreparace rekombinantních plazmidů alkalickou metodou .....	41
4.19.17	Rekombinace plazmidů systémem Gateway – LR rekombinace .....	42
4.19.18	Transformace bakterií elektroporací .....	42
5	Výsledky: .....	43
5.1	Studium vlivu HDAC6 na replikační cyklus polyomavirů .....	43
5.1.1	Stanovení efektivní inhibiční koncentrace tubacinu .....	43

5.1.2	Izolace viru MPyV .....	49
5.1.3	Inhibice HDAC6 tubacinem snižuje efektivitu infekce buněk MPyV .....	49
5.1.4	Inhibice HDAC6 v pozdní fázi infekce negativně ovlivňuje množství virových proteinů v infikovaných buňkách.....	54
5.1.5	Nepřítomnost HDAC6 má negativní vliv na replikaci viru .....	56
5.1.6	Vliv jednotlivých domén HDAC6 na efektivitu infekce MPyV .....	63
5.2	Příprava expresních plazmidů a buněčných linií pro studium vlivu HDAC6 na tumorogenezi indukovanou polyomaviry .....	70
5.2.1	Příprava expresního plazmidu pEF1-MPyV-early .....	70
5.2.2	Příprava expresního plazmidu pEF1-BKPyV-early .....	75
5.2.3	Příprava buněk s KO-HDAC6.....	79
6	Diskuse: .....	81
7	Závěr:.....	87
8	Seznam použité literatury:.....	88

## 1 Úvod:

Viry jsou obligátní intracelulární parazité, kteří ke své replikaci využívají translační aparát hostitelských buněk, stejně tak jako využívají i řadu dalších buněčných procesů. Ačkoliv je samotné neřadíme k živým organismům, mají velký vliv na celou řadu organismů, ať již se jedná o viry v oceánech, rostlinné viry, viry způsobující infekce živočichů, či viry ovlivňující lidskou společnost. Viry se s námi pojí už tisíceletí a evolučně se přizpůsobují svým hostitelům ať již kódováním celé řady proteinů specifických funkcí, tak i kódováním proteinů zastávajících širokou škálu funkcí. Široké funkční spektrum jednotlivých proteinů je typické i pro malé neobalené viry čeledi *Polyomaviridae*. Tyto viry nesou jen hrstku proteinů, ale i s málem jsou schopné v hostitelských buňkách způsobit persistentní infekci a případně indukovat buněčnou transformaci pomocí svých multifunkčních tumorogenních (T) antigenů.

Obdobně jako polyomavirové T antigeny zastávají mnoho funkcí při infekci buněk a regulaci jejich buněčného cyklu, tak i některé buněčné proteiny mohou zastávat mnoho funkcí. Příkladem takového proteinu je hlavní cytoplazmatická deacetyláza patřící do rodiny histon deacetyláz typu II.b, histon deacetyláza 6 (HDAC6). HDAC6 je unikátním zástupcem histon deacetyláz jednak úplnou duplikací evolučně konzervované deacetylační domény, ale také téměř výhradní lokalizací v cytoplazmě, a hlavně přítomností ubiquitin-vazebné domény. Přítomnost třech funkčních domén – dvou domén s katalytickou funkcí a jedné ubiquitin vazebné, umožňuje HDAC6 regulovat buněčnou signalizaci, migraci a proliferaci buněk, přirozenou imunitní odpověď a mnoho dalších. Mezi řadu buněčně zásadních funkcí HDAC6 se ovšem v posledních letech přidali také negativní spojení tohoto proteinu s výskytem v mnoha typech nádorů. Jako příklad můžeme uvést rakovinu prsu, vaječníků či některé typy leukémií. Současně s novými poznatky o zvýšené expresi HDAC6 v nádorových tkáních vzrůstají snahy o nalezení inhibitorů HDAC6, které by mohly být využity v terapii zmíněných nádorů a zároveň také snahy o porozumění funkce HDAC6 v antivirové imunitní odpovědi a celkově ve vlivu tohoto proteinu na replikační cyklus virů jako je virus chřipky typu A či virus imunitní nedostatečnosti HIV-1.

Doposud však není objasněna role HDAC6 u žádného viru s DNA genomem. V této práci se tedy zabýváme prvotním objasněním vlivu HDAC6 na replikační cyklus polyomavirů.

## 2 Literární přehled:

### 2.1 Viry čeledi *Polyomaviridae*

Polyomaviry byly poprvé popsány již v 50. letech 20. století na příkladu myšího polyomaviru (MPyV), který je dodnes jedním z hlavních modelových virů v molekulární biologii (Gross 1953). Během 70. let byly identifikovány první lidské polyomaviry, které nesou v názvu iniciály pacientů, z nichž byly izolovány – BK virus (BKPyV) a JC virus (JCPyV) (Gardner et al., 1971; Padgett et al., 1971). Původně spadaly polyomaviry společně s papilomaviry do čeledi *Papovaviridae*, ale od roku 1999 se jedná o samostatnou čeleď (Pringle 1999; van Regenmortel et al., 2000). Čeleď *Polyomaviridae* podle ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) v současnosti zahrnuje 102 druhů polyomavirů, které byly podle sekvence velkého tumorogenního antigenu (LT) rozděleny do 4 rodů – *Alfapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Gammapolyomavirus* a *Deltapolyomavirus*, přičemž 5 druhů polyomavirů zůstává nezařazeno (aktuální podle <https://talk.ictvonline.org/taxonomy> ke dni 11.4.2021). Nejrozsáhlejším rodem s 44 druhy je *Alfapolyomavirus* (Moens et al., 2017). Do tohoto rodu patří i modelový MPyV a pátý polyomavirus objevený u člověka, polyomavirus karcinomu Merkelových buněk (MCPyV). MCPyV je zároveň prvním zástupcem čeledi uznaným jako etiologické agens nádoru (Feng et al., 2008; Chang a Moore 2012). Rod *Alfapolyomavirus* je následován rodem *Betapolyomavirus* se 36 zástupci, mezi něž patří i nejznámější lidské polyomaviry BKPyV a JCPyV.

Jedná se o malé neobalené DNA viry, které infikují široké hostitelské spektrum od savců, po ryby a ptáky. Zatímco polyomaviry infikující savce a ptáky jsou známy již desítky let, viry infikující ryby byly objeveny poměrně recentně (Peretti et al., 2015; Calvignac-Spencer et al., 2016; Dill et al., 2016; Moens et al., 2017). Kromě zmíněných hostitelů z řad obratlovců byly části genomu polyomavirů objeveny také u některých bezobratlých (Buck et al., 2016). Například u zástupců pavoukovců, *Stegodyphus mimosarum*, *Parasteatoda tepidariorum* a *Acanthoscurria geniculata*, byla nalezena endogenní sekvence kódující gen podobný polyomavirovému LT antigenu. Tato endogenní „fosilní“ LT sekvence se přitom od pravého LT antigenu liší pouze dvěma mutacemi. Další zajímavostí, podporující evolučně starý původ polyomavirů, je i nález sekvence téměř celého polyomavirového genomu u štíra *Centruroides exilicauda* (Buck et al., 2016).

### 2.1.1 Organizace genomu

Genom polyomavirů je uložen v ikosahedrální kapsidě s průměrem ~45 nm, tvoří ho cirkulární molekula dvouřetězcové DNA a polyomaviry tak spadají do I. skupiny Baltimorova klasifikačního schématu. Velikost genomu polyomaviry patří k malým virům, udává se velikost kolem 5 kbp, přičemž zástupci s nejkratším (3962 bp) i nejdelším (7369 bp) genomem infikují ryby (Calvignac-Spencer et al., 2016; Dill et al., 2016). Molekula virové DNA je asociována s buněčnými histony s výjimkou histonu H1. Genom všech polyomavirů vykazuje stejné organizační členění a může být rozdělen do třech oblastí. Jedná se o regulační nekódující oblast a dvě kódující oblasti – časná a pozdní (obrázek 1).

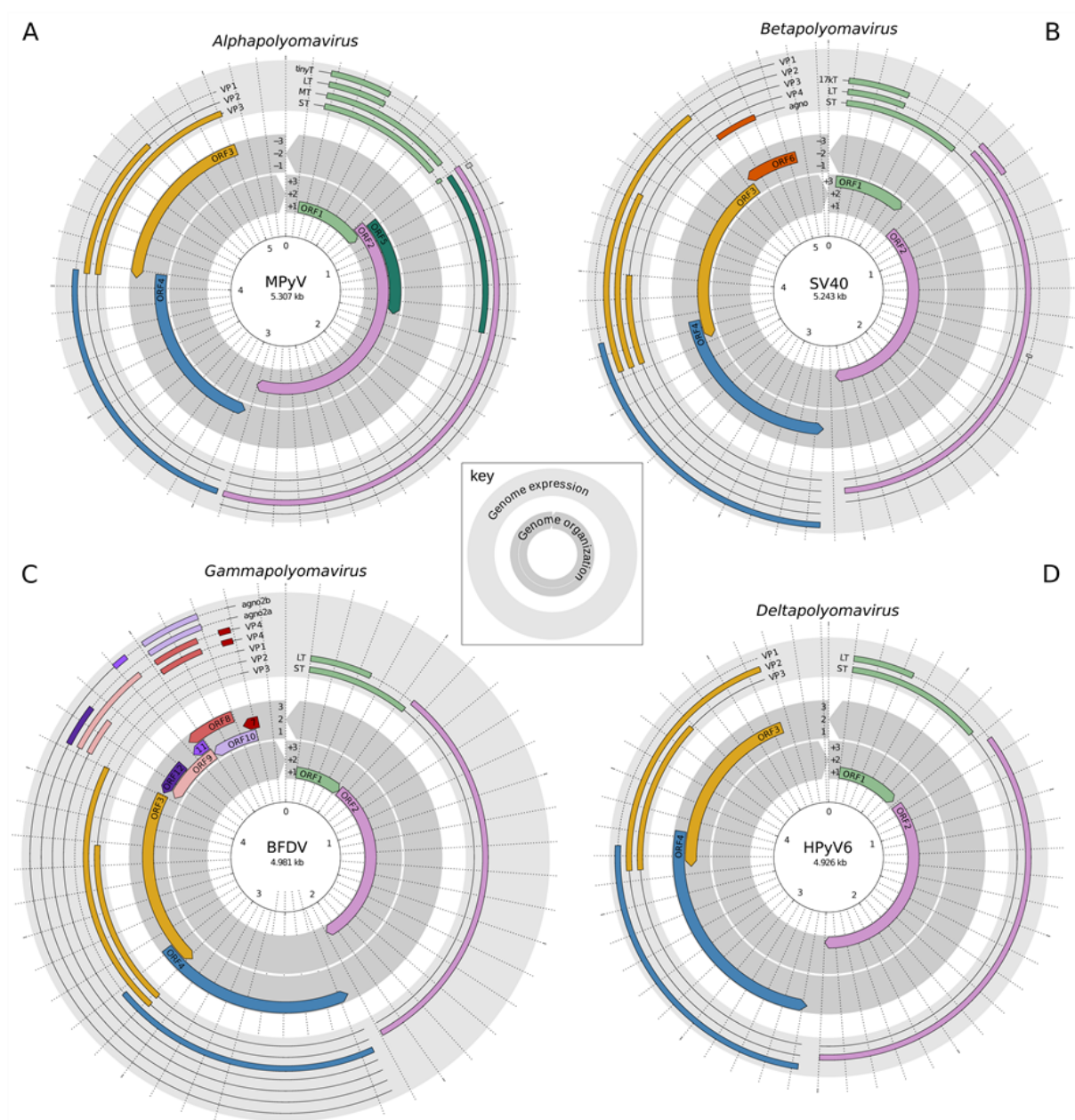
Regulační oblast je u všech polyomavirů situována mezi časnou a pozdní kódující oblastí. Nachází se v ní počátek replikace (*ori*), promotory pro transkripci časných a pozdních genů a enhancery transkripce (Crawford et al., 1974). Regulační oblast nese nejen informace pro kontrolu virového replikačního cyklu, ale také kóduje informace určující hostitelskou specifitu, tkáňový tropismus viru i výsledné patogenní projevy v infikovaných buňkách (Moens et al., 2017). Ačkoliv je sekvence pro počátek replikace v rámci jednoho druhu evolučně konzervovaná, obecně lze říci, že je regulační oblast poměrně variabilní, a to jak mezi různými druhy, tak i v rámci jednoho druhu polyomaviru (White et al., 2009; Moens et al., 2020). I u lidských polyomavirů se velikost regulační oblasti díky vysoké míře duplikací a delecí zásadně liší, od 267 bp u JCPyV až po 645 bp u WUPyV (Moens et al., 2020). Význam variability regulační oblasti byl detailně popsán na řadě polyomavirů (Rubinstein et al., 1987; Feigenbaum et al., 1992; Gosert et al., 2008), včetně modelového MPyV. Jednotlivé řetězce MPyV lišící se v regulační oblasti genomu vedou ke vzniku rozličných nádorů a různé frekvenci jejich vzniku a zároveň sekvence regulačního regionu ovlivňují tkáňovou specifitu (Freund et al., 1988; Rochford et al., 1990; 1992). U dalšího modelového zástupce čeledi, opičího viru SV40, byl také popsán význam variability regulační oblasti na patogenезi (Feigenbaum et al., 1992; Lednický et al., 1998; Sroller et al., 2008). *In vivo* onkogenní potenciál SV40-indukovaných nádorů u křečků *Mesocricetus auratus* se prokázal závislý na uspořádání regulační oblasti, kdy varianty viru s jednoduchou organizací nekódující oblasti vykazovaly vyšší tumorogenní potenciál oproti variantám se dvěma enhancery transkripce (Sroller et al., 2008).

Transkripce kódujících oblastí běží obousměrně, což je běžný mechanismus u většiny dsDNA virů. Z jednoho řetězce DNA jsou přepisovány časné geny a z druhého ty pozdní. Časná oblast



genomu je transkribována z několika čtecích rámců ihned po vstupu virionu do buněčného jádra (Carmichael 2016; Horníková et al., 2020a). Transkripce je pod kontrolou promotoru nesoucího TATA box a je závislá na buněčné RNA polymeráze II. Nejprve vzniká pre-mRNA, ze které dochází alternativním sestřihem k tvorbě sekundárních transkriptů tumorogenních (T) antigenů. Všechny polyomaviry kódují alespoň dva tumorogenní antigeny, velký LT a malý ST antigen (Carmichael 2016; Horníková et al., 2020a). Některé viry však kódují i další časné proteiny, v případě MPyV se jedná o střední MT antigen a u MCPyV je to homolog MT antigenu, alternativní T antigen (tzv. ALTO). T antigeny jsou pro virovou replikaci nepostradatelné, protože jejich exprese vede k vstupu infikované buňky do S fáze buněčného cyklu a virus tak může lépe využít buněčnou mašinerii pro svou vlastní syntézu. Exprese T antigenů také může v infikovaných buňkách vést k jejich transformaci a vzniku nádorů (detailněji popsáno v následujících kapitolách). V prvních hodinách po infekci dochází pouze k významné genové expresi T antigenů, nikoliv pozdních genů. Přítomnost LT antigenu je důležitá pro iniciaci replikace virové DNA, regulaci transkripce časných genů prostřednictvím vazby do nekódující oblasti v blízkosti *ori* a přechod z časné do pozdní fáze transkripce (Farmerie a Folk 1984; Dailey a Basilico 1985; Liu a Carmichael 1993). Ačkoliv v časně fázi infekce probíhá i zanedbatelná transkripce pozdních genů, masivní transkripce pozdních genů začíná až po replikaci virové DNA.

Zatímco časná oblast je pod kontrolou promotoru se sekvencí TATA boxu, v promotoru pozdní oblasti se TATA box nenalézá (Moens et al., 2017). Obdobně jako u časných genů i geny pozdní jsou transkribovány do primárního transkriptu, ze kterého vznikají alternativním sestřihem mRNA strukturních virových proteinů. Majoritní VP1 protein je transkribován v rámci jiného čtecího rámce než minoritní proteiny VP2 a VP3. Kratší varianta VP3 sdílí 2/3 C' koncové sekvence s VP2 proteinem. Ačkoliv všechny strukturní proteiny nesou jaderný lokalizační signál (NLS), přítomnost minoritních strukturních proteinů se prokázala zcela nepostradatelná pro přesun VP1 do jádra (Horníková et al., 2017; Soldatova et al., 2018). Kromě hlavního strukturního proteinu VP1, minoritních proteinů VP2 a VP3 jsou u některých virů kódovány ještě doplňkové pozdní proteiny. Například BKPyV a JCPyV v pozdní oblasti kódují agnoprotein a SV40 nese kromě agnoproteinu i VP4, který však na rozdíl od ostatních VP proteinů není součástí virové kapsidy. Agnoprotein a VP4 se podílí spíše na konečných fázích virové infekce, lytickém uvolnění virů z buňky, regulaci a udržování perzistentní infekce (White et al., 2009).



**Obrázek 1: Společné organizační členění genomu polyomavirů:** Genom všech rodů polyomavirů – Alfa-, Beta-, Gamma- i Deltapolyomavirus (**A-D**) lze rozdělit do 3 částí, jedná se o regulační nekódující oblast a dvě kódující oblasti, jejichž transkripce probíhá v opačném směru a v rámci několika čtecích rámců (ORF). Časná oblast všech polyomavirů kóduje alespoň 2 tumorogenní antigeny – LT a ST, u některých virů však můžeme nalézt i další doplňové T antigeny. V pozdní oblasti jsou kódovány strukturní proteiny virové kapsidy VP1-VP3, které opět mohou být doplněny o další pozdní proteiny. (převzato z Moens et al., 2017)

### 2.1.2 Virová kapsida

Polyomaviry jsou neobalené viry a jejich viriony se skládají pouze z proteinové kapsidy a nukleové kyseliny asociované s buněčnými histony. Strukturní protein VP1 je hlavní stavební složkou virové kapsidy ikosahedrálního tvaru. Kapsida je tvořena 72 kapsomerami, které jsou složeny z 5 molekul VP1 proteinu doplněných o 1 molekulu minoritního proteinu VP2 nebo VP3 (Forstová et al., 1993; Barouch a Harrison 1994). Komplex VP1-VP2/VP3 je stabilizován hydrofobními interakcemi a je translokován z cytoplazmy do buněčného jádra. Lokalizace do jádra je zprostředkována vazbou NLS strukturních proteinů na  $\alpha$  a  $\beta$  importiny a následný transport přes nukleopóry (Horníková et al., 2017; Soldatova et al., 2018). V buněčném jádře poté dochází ke skládání virových částic z kapsomer a nově syntetizované molekuly virového genomu.

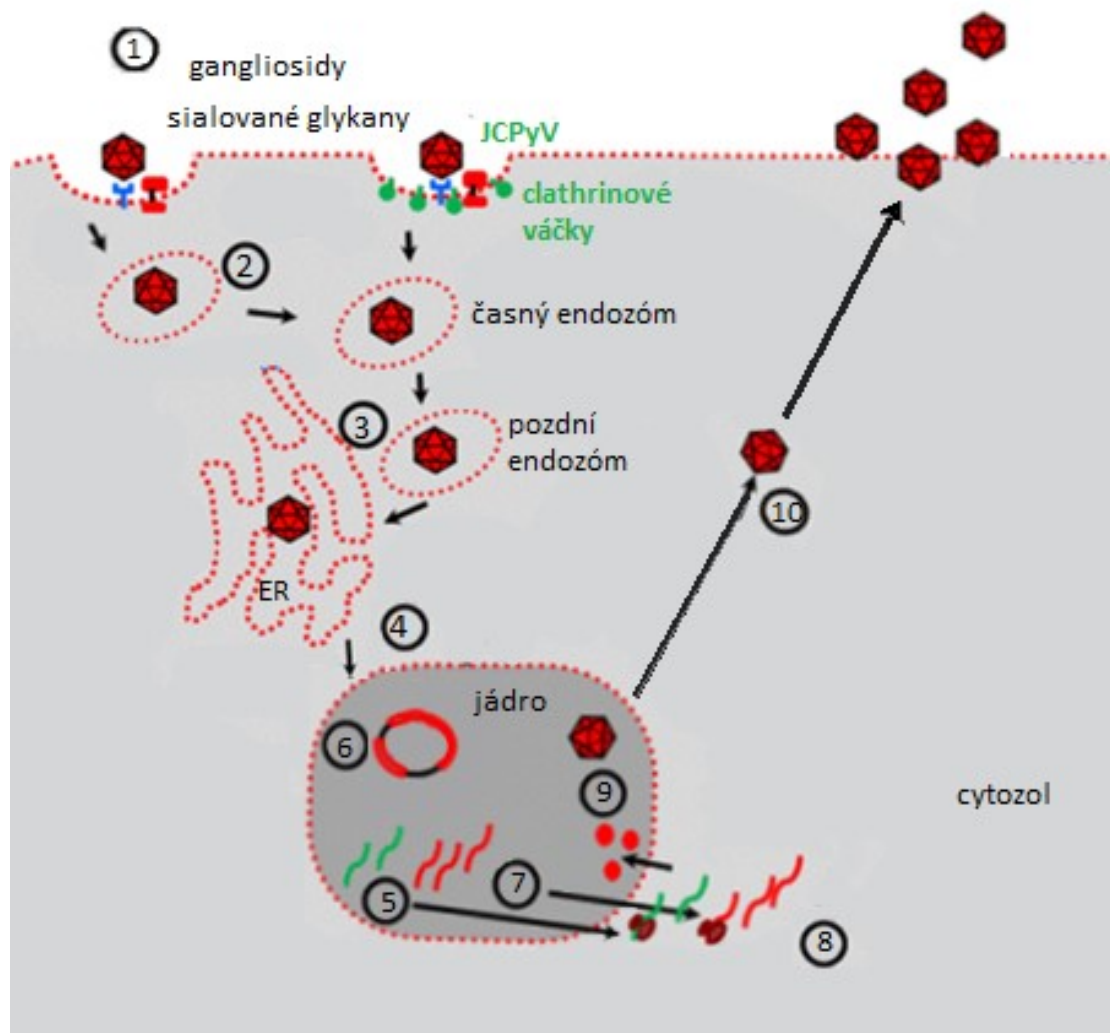
### 2.1.3 Replikační cyklus

Replikační cyklus polyomavirů můžeme v zásadě rozdělit do třech fází. V první fázi infekce dochází k vazbě virové partikule na receptor buněčné membrány a transport virionu do místa replikace, tedy buněčného jádra. V druhé fázi infekce dochází k produkci virových proteinů a replikaci virové DNA. Třetí fází je skládání virových partikulí a uvolnění nově produkováných virionů z buňky (obrázek 2).

První fáze infekce začíná vazbou virionu na buněčné receptory a koreceptory, které se liší dle typu polyomaviru. Obecně je pro vazbu důležitý VP1 protein, který se váže na zbytky kyseliny sialové v buněčných glykoproteinech a gangliosidech. Některé polyomaviry navíc využívají koreceptory pro další upevnění této vazby. Jako příklad můžeme uvést MPyV, který pomocí VP1 interaguje s GD1a a GT1b receptory a také využívá dodatečnou vazbu VP1 a VP2 proteinů na koreceptor -  $\alpha 4\beta 1$  integrin (Tsai et al., 2003; Caruso et al., 2003; Low et al., 2006). Většina polyomavirů je po vazbě na cytoplazmatickou membránu internalizována do buněk monopinocytickými váčky, ale JCPyV vstupuje do buněk ve klatrinových váčkách (Pho et al., 2000; Richterová et al., 2001; Liebl et al., 2006). Virus je dále transportován časnými a pozdními endozómy cíleně do hladkého endoplazmatického retikula. Virus se při této cestě zcela vyhýbá Golgiho aparátu a je závislý na nízkém pH v endozómech (Liebl et al., 2006).

V hladkém endoplazmatickém retikulu dochází k částečnému rozvolnění virové kapsidy v důsledku rozrušení disulfidických můstků VP1. Minoritní virové proteiny VP2 a VP3 mají

funkci viroporinů a v membráně ER vytvářejí tzv. *foci* místa, kterými je virus uvolněn do cytoplazmy (přehledně shrnuto v Horníková et al., 2020a). V cytosolu se částečně rozvolněné virové částice shromažďují v blízkosti jádra (~3 hpi) a prostřednictvím NLS strukturní proteiny interagují s importiny (Zila et al., 2014; Soldatova et al., 2018). Skrze nukleopóry se virus dostává do buněčného jádra, kde se spouští transkripce časných genů (~6 hpi). Produkce T antigenů (detekovatelné ~8 hpi) vede v buňkách k deregulaci buněčného cyklu a vstupu buňky do S fáze. Děje se tak zejména díky LT antigenu, který se váže na tumor-supresorové proteiny pRb a p53, a ST antigenu, který inaktivuje protein fosfatázu PP2A. Inhibice serin/threonin fosfatázy PP2A vede k přesunu z G do S fáze buněčného cyklu (Lane a Crawford 1979; DeCaprio et al., 1988; Pallas et al., 1990). Zhruba 12-16 hpi se spouští replikace virového genomu a postupně začíná převažovat transkripce pozdních genů (Liu a Carmichael 1993). Replikaci iniciuje LT antigen, který se váže do *ori* a svou helikázovou aktivitou rozplétá dvoušroubovici virové DNA (Goetz et al., 1988; Wang a Prives 1991). V poslední fázi infekce dochází v jádře k morfogenezi nových virových partikulí a následnému uvolnění virového potomstva lyzí buňky (~48 hpi).

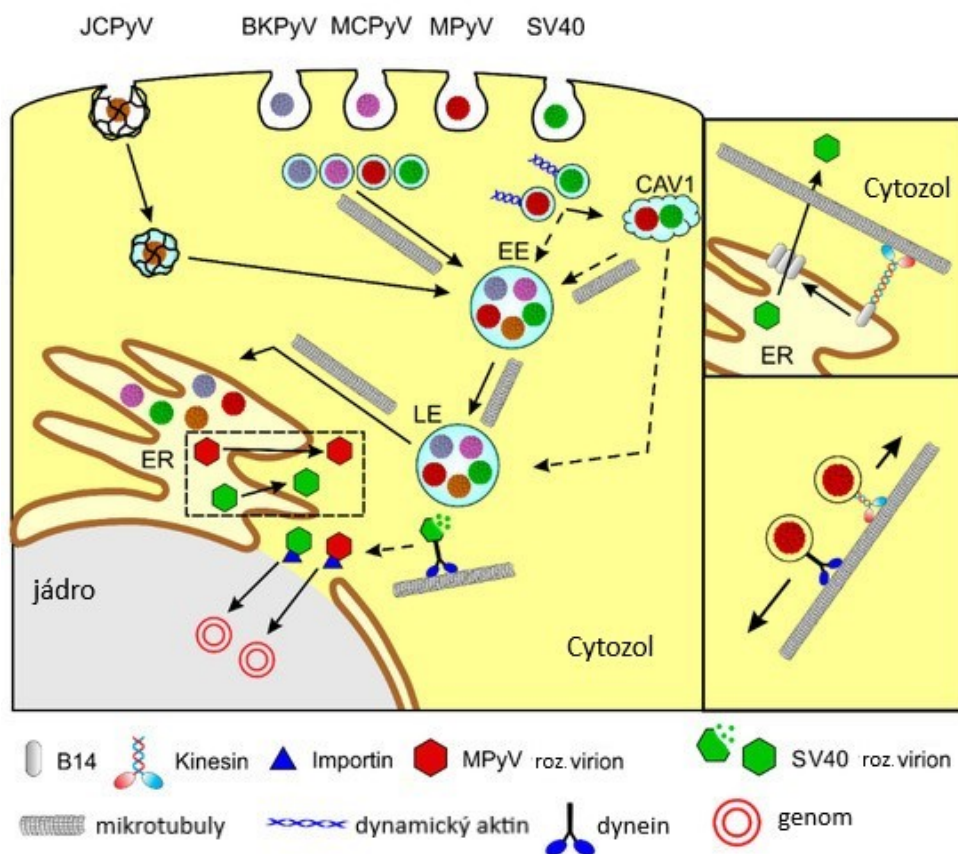


**Obrázek 2: Schématické znázornění replikačního cyklu polyomavirů.** (1) V první fázi infekce se viriony váží na membránové receptory, většinou sialované glykany. (2) Do buněk viry vstupují v monopinocytických vezikulech, nebo v případě JCPyV v klatrinových váčcích. (3) Viriony putují přes časné a pozdní endozómy až do endoplazmatického retikula (ER). (4) Z ER jsou viriony uvolněny v částečně rozvolněném stavu do cytosolu a v perinukleárním prostoru se váží na importiny, pomocí nichž jsou translokovány do buněčného jádra. (5) V jádře nejprve dochází k transkripci časných genů, poté k replikaci virového genomu (6) a transkripci pozdních genů (7). Časné a pozdní proteiny jsou translatovány v cytoplazmě (8). Strukturní proteiny se v cytoplazmě skládají do kapsomer, které jsou následně translokovány zpět do jádra, kde dochází k morfogenezi nových virionů (9). Nově produkované částice se z buňky uvolňují lyzí (10). (Upraveno podle Giannecchini, 2020)

#### 2.1.3.1 Význam mikrotubulů v replikačním cyklu polyomavirů

Viry pro svou úspěšnou replikaci využívají nejen replikační aparát hostitelských buněk, ale i řadu dalších buněčných proteinů a procesů, včetně posttranslačních modifikací. Během transportu z buněčné membrány do jádra polyomaviry interagují také s proteiny cytoskeletu. Ačkoliv role aktinových vláken je doposud neobjasněná, role mikrotubulů a s nimi asociovanými proteiny se pro úspěšný průběh polyomavirové infekce ukázala být nepostradatelná. Polyomaviry interagují s mikrotubuly jak v časných, tak i v pozdních fázích infekce a ovlivňují jejich acetylaci (přehledně shrnuto v Horníková et al., 2020a). Pro ovlivnění stavu acetylace mikrotubulů je důležitý zejména VP1, který sám podstupuje řadu posttranslačních modifikací, včetně fosforylace, methylace, sulfonylace, hydroxylace a acetylace (Bolen et al., 1981; Ludlow a Consigli 1987; 1989; Li et al., 1995; Burton a Consigli 1996). VP1 v pozdních fázích infekce stabilizuje mikrotubuly a zvyšuje aktivitu cytoplazmatické acetyltransferázy  $\alpha$ TAT1 (Horníková et al., 2020b)

Ihned po vstupu viru do buňky je síť mikrotubulů využívána pro transport z jaderné membrány do endoplazmatického retikula (obrázek 3). Přítomnost mikrotubulů je zcela nepostradatelná pro úspěšný transport virionů většiny polyomavirů, ačkoliv není vyžadováno jejich udržování v dynamickém stavu (Pelkmans et al., 2001; Gilbert et al., 2003; Eash a Atwood 2005; Becker et al., 2019). Viriony jsou v endocytických váčcích transportovány podél mikrotubulů za účasti buněčných motorů, dyneinu a kinesinu (Zila et al., 2014). Spolupráce s dyneinem byla popsána i po úniku virionů z endoplazmatického retikula v následném rozvolňování kapsidy (Ravindran et al., 2018). V pozdějších fázích infekce virové proteiny také interagují s mikrotubuly. Během transkripce T antigenů dochází k destabilizaci mikrotubulů v důsledku ovlivnění buněčných signálních drah (přehledně shrnuto v Horníková et al., 2020a). Naopak strukturní proteiny mikrotubuly opět stabilizují. Zejména interakce strukturního proteinu VP1 s mikrotubuly je důležitá pro replikační cyklus virů. Tvorba komplexu VP1 s mikrotubuly vede ke zvýšení jejich acetylace, stabilizaci a k následnému zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi (Horníková et al., 2017; 2020b).



**Obrázek 3: Schéma využití mikrotubulů v prvních fází replikačního cyklu polyomavirů.** Polyomaviry se po vstupu do buněk pomocí monopinotických váčků, či klatrinem obalených vezikulů pohybují podél mikrotubulů. SV40 k pohybu navíc využívá také dynamický aktin. Viriony se dále za využití buněčných motorů, kinesinu a dyneinu, pohybují podél mikrotubulů v časných a pozdních endozómech, dokud se nedostanou do hladkého endoplazmatického retikula (ER). Z ER se viriony dostávají v částečně rozvolněném stavu do cytozolu, kde znovu interagují s dyneinem a dochází k dalšímu rozvolnění virové kapsidy. Do buněčného jádra se viry dostanou skrze nukleopory a vazbu na importiny. (převzato a upraveno podle Horníková et al., 2020a)

#### 2.1.4 Tumorogenní antigeny a jejich onkogenní potenciál

Samotný název polyomavirů pochází z řeckého *poly* (mnoho) a *oma* (tumor). Již při objevení prvních polyomavirů si totiž vědci povšimli jejich spojení s různými nádory ve zvířecích hostitelích. Jako první virus spojený s výskytem nádorů byl roku 1954 popsán myší polyomavirus (MPyV), když doktor Gross původně hledal infekční agens leukémie v myších a náhodou objevil virus způsobující nádory párových slinných žláz (Gross 1953). V následujících letech byly postupně objeveny další polyomaviry a byly popsány nejen tumorogenní projevy polyomavirové infekce u hlodavců, ale i dalších zvířat. V 60. letech byl objeven virus SV40, který se vyskytoval jako kontaminace Sabinových atenuovaných vakcín proti polioviru a když pak byly v 70. letech popsány první lidské polyomaviry asociované s výskytem nádorů u

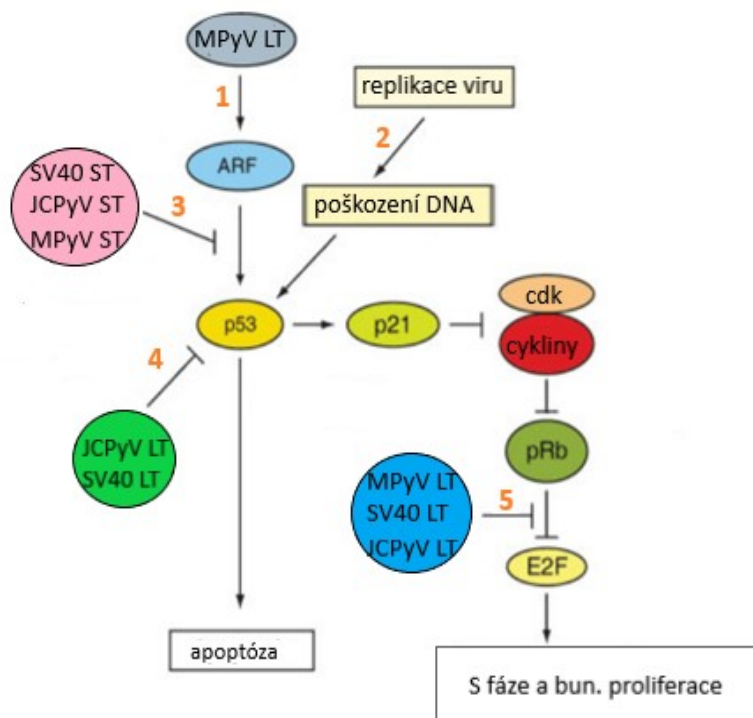
hlodavců, tato kauza ještě zvýšila snahu o porozumění spojení mezi polyomaviry a výskytem nádorů (Sweet a Hilleman 1960; Gardner et al., 1971; Padgett et al., 1971). Ačkoliv se onkogenní potenciálu polyomavirů stal hojně studovaným, jeho jednoznačné potvrzení u lidí přišlo až poměrně nedávno. Prvním polyomavirem prokazatelně způsobujícím nádorovou transformaci u lidí se stal MCPyV, který vyvolává agresivní typ rakoviny kůže, karcinom Merkelových buněk (Feng et al., 2008; Chang a Moore 2012).

Za onkogenní potenciál polyomavirů jsou zodpovědné tumorogenní antigeny. T antigeny jsou multifunkční proteiny, které jsou důležité pro úspěšnou produkci viru modulací řady buněčných procesů. Vedou buňky ke vstupu do S fáze buněčného cyklu a spouštějí procesy kontroly poškození DNA, aby podpořili replikaci virové DNA. Samotná exprese T antigenů v transfekovaných buňkách vede k jejich transformaci (Lane a Crawford 1979; Treisman et al., 1981; Carmichael et al., 1982). Při studiu mechanismů nádorové transformace indukované polyomaviry bylo identifikováno mnoho buněčných proteinů, s nimiž T antigeny interagují jako například pRb, p107, p130, p53 či kinázy c-src, PI3, PLC- $\gamma$  a fosfatáza PP2A (DeCaprio et al., 1988; Chellappan et al., 1992; Dunant et al., 1996; Khalili et al., 2008).

Ačkoliv k transformaci přispívají všechny T antigeny, nepostradatelnou roli u SV40 má hlavně LT antigen, který ovlivňuje tumorsupresorové dráhy spojené s p53 a pRb a jeho samotná exprese dokáže vyvolat buněčnou transformaci (Lane a Crawford 1979; DeCaprio et al., 1988; Ludlow et al., 1990; Zhu et al., 1991; Chellappan et al., 1992; DeCaprio 1999). LT antigen je složen ze čtyř evolučně konzervovaných domén. Ve směru od N'-konce se jedná o J doménu, Zn-vazebnou doménu, doménu vážící *ori* (OBD) a ATPázovou doménu. J doména funguje podobně jako buněčné chaperony, je nepostradatelná pro udržování persistentní infekce, vyvazuje transkripční faktor E2F z komplexu s pRb a přispívá k buněčné transformaci (Moran 1988; Peden et al., 1990; Yaciuk et al., 1991; Powell et al., 1999). OBD doména je specifická DNA vazebná doména, která iniciuje replikaci virového genomu. Mezi J doménou a OBD doménou se nachází variabilní region, který se délkou liší mezi jednotlivými polyomaviry a obsahuje vazebná místa pro řadu buněčných proteinů, včetně kinázy Bub1 a pRb. Zn-vazebná doména nese helikázovou aktivitu LT antigenu a ATPázová doména zajišťuje energetický přísun. Obecně spolupráce jednotlivých domén zajišťuje širokou funkční variabilitu LT antigenu (shrnutí v An et al., 2012). Jak bylo zmíněno, jednou z funkcí LT antigenu je i vazba tumor supresoru p53 (Lane a Crawford 1979; Zhu et al., 1991), který je kritickou obranou



buňky proti nekontrolované proliferaci a ve zdravých buňkách v případě buněčného stresu vede k apoptóze. Jelikož taková reakce by mohla omezovat množení viru, řada DNA virů si vyvinula mechanismy, jak ovládnout p53 ve svůj prospěch, a to je i případ polyomavirů (obrázek 4) (Khalili et al., 2008).



**Obrázek 4: Indukce buněčné transformace působením polyomavirů. (1-2)** Aktivace alternativního čtecího rámce (ARF) tumorogenními antigeny nebo replikace virové DNA může v buňkách spustit aktivaci obranných drah p53, které vedou buď k apoptóze nebo k zastavení buněčného cyklu. Aby předcházely apoptóze infikované buňky či blokaci buněčného cyklu působením p53 a dalších regulačních proteinů (cykliny, cyklin-dependentní kinázy a pRb), vyvinuly polyomaviry několik mechanismů (značeny 3-5), jak regulaci buněčného cyklu drahou p53, případně pRb inhibovat a obrátit ve svůj prospěch. **(3)** ST antigeny brání aktivaci signalizace prostřednictvím ARF dráhy. **(4)** LT antigeny přímo váží p53 a inhibují jeho funkci **(5)** LT antigeny se váží na pRb, vyvazují tak transkripční faktor E2F a aktivují vstup buněk do S fáze a případně vedou k nadměrné buněčné proliferaci. (Upraveno a zjednodušeno podle Khalili et al., 2008)

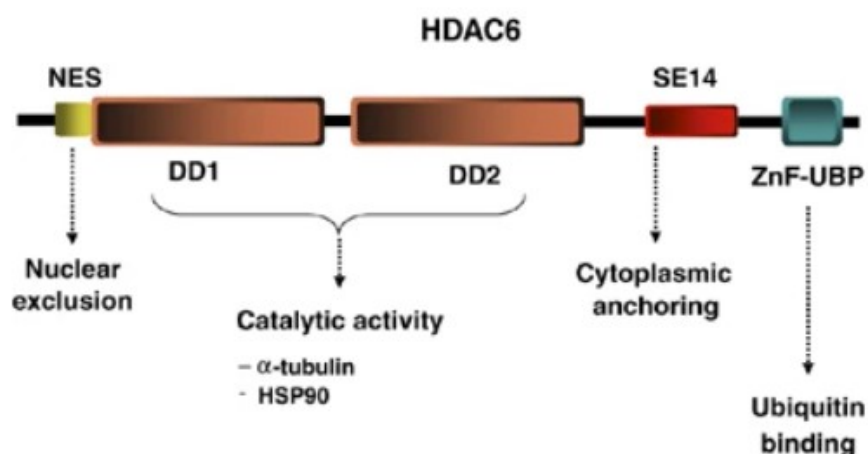
U myšího polyomaviru samostatná produkce LT antigenu nevede k buněčné transformaci a MPyV na rozdíl od jiných zástupců čeledi ani neváže p53. Mechanismus indukce buněčné transformace u MPyV tedy vedl k identifikaci tumorogenních účinků především středního MT antigenu, který exprimovaný v buňkách samostatně dokáže nejen transformaci vyvolat, ale také dlouhodobě udržet (Treisman et al., 1981). Dunant et al., identifikovali interakci MT

antigenu s buněčnými kinázami c-Src, c-Yes a Fyn (Dunant et al., 1996) a právě signalizace přes Src rodinu kináz je důležitá pro tumorogenní vlastnosti MT (Fluck a Schaffhausen 2009).

ST a případně další varianty T antigenů s LT sdílejí podobnost v N'-koncové sekvenci, kde se i v případě ST a MT vyskytuje transformačně důležitá J doména, ve směru k C'-konci začínají T antigeny více diverzifikovat (Srinivasan et al., 1997). Významná role ST antigenu v buněčné transformaci spočívá právě ve schopnosti J domény vázat serin/threonin fosfatázu PP2A. ST antigen se váže na B podjednotku fosfatázy PPA2, tím PPA2 inhibuje a inhibice nepřímo vede buňku do S fáze (Pallas et al., 1990). Kromě toho vazba ST na PPA2 vede k modulaci translačně důležité dráhy mTOR, jejíž ovlivněním řada virů upřednostňuje translaci svých proteinů před proteiny hostitelských buněk (Yu et al., 2005).

## 2.2 Histon deacetyláza 6

Histon deacetyláza 6 (HDAC6) je buněčný multifunkční protein patřící společně s HDAC10 do třídy histon deacetyláz II B. Byla objevena v roce 1999 na základě homologie v evolučně konzervované katalytické doméně s kvasinkovým RPD3 (Grozinger et al., 1999; Verdel a Khochbin 1999). Jako jediná z rodiny nese HDAC6 úplnou duplikaci velké HDAC-homologní domény. HDAC6 obsahuje kromě dvou katalytických domén, také ubiquitin-vazebnou doménu (Seigneurin-Berny et al., 2001), což tomuto proteinu umožňuje nejen funkci v deacetylaci proteinů, ale také roli v jejich metabolismu, zejména pak degradaci. Díky silnému exportnímu signálu z jádra (NES) s leucinově bohatými motivy je HDAC6 aktivně udržována v cytoplazmě (Verdel et al., 2000). U lidského ortologu nalezneme navíc ještě SE14 doménu, která pomocí 8 tetradekapeptidových motivů funguje jako další posílení cytoplazmatické lokalizace a ukazuje tak na evoluční tlak pro udržení HDAC6 v cytoplazmě (obrázek 5) (Bertos et al., 2004). Navzdory názvu HDAC6 mezi její substráty histony nepatří, zato má HDAC6 širokou škálu cytoplazmatických substrátů, mezi které můžeme zařadit například  $\alpha$ -tubulin, kortaktin,  $\beta$ -catenin, chaperon Hsp90 či receptor RIG-I (Hubbert et al., 2002; Kovacs et al., 2005; Zhang et al., 2007; Li et al., 2008; Liu et al., 2016).



**Obrázek 5: Schéma uspořádání domén HDAC6.** Ve směru od N' konce proteinu se nachází jaderný exportní signál (NES), který je následován dvěma deacetylačními doménami DD1 a DD2. Lidská HDAC6 za katalytickými doménami nese také repetitivní sekvenci SE14, jenž funguje jako cytoplazmatická kotva. Na karboxy konci proteinu se nachází ZnF ubiquitin-vazebná doména (UBP). (převzato z Boyault et al., 2007a)

### 2.2.1 Katalytické funkce

Reversibilní acetylace je důležitá posttranslační modifikace nejen u histonů, kde se podílí na rozvolňování chromatinu, ale také u nehistonových proteinů, kde hraje odstranění acetylové skupiny z lyzinu významnou roli v buněčné signalizaci. Hlavní cytoplazmatickou deacetylázou je právě zmiňovaná HDAC6, která díky své katalytické funkci patří k nejdůležitějším proteinům zaopatřujícím deacetylaci buněčných, ale případně i exogenních proteinů v cytoplazmě. DD1 a DD2 domény HDAC6 ovlivňují skrze deacetylaci řadu buněčných procesů, ať již se jedná o signální dráhy, polarizovaný transport endocytických váčků podél mikrotubulů, migraci, angiogenezi, proliferaci, buněčnou motilitu nebo nepřímou regulaci transkripce (přehledně shrnuto v Boyault et al., 2007a; Seidel et al., 2015).

Od objevení úplné duplikace katalytické domény, která u jiných deacetyláz nemá obdoby, se vědci zajímali, která z dvou domén je pro deacetylaci důležitější. Výsledky těchto studií jsou však dodnes sporné. Zatímco některé studie provedené za využití  $\alpha$ -tubulinu vedly k tvrzení, že obě domény, DD1 a DD2 včetně nezměněné oblasti mezi nimi, jsou nepostradatelné pro deacetylaci (Zhang et al., 2003; 2006), jiné studie tyto výsledky vyvracely. Zou et al., integritu katalytických domén nepovažují za nezbytnou. Z jejich studii využívajících histidinové mutace v aktivním místě každé z deacetylačních domén a následném měření kinetiky reakce se katalytická funkce ukázala závislá na DD2 doméně (Zou et al., 2006).

Jeden z prvních popsanych substrátů HDAC6 je  $\alpha$ -tubulin, buněčný protein podílející se na stavbě mikrotubulů.  $\alpha$ -tubulin tvoří dimery s  $\beta$ -tubulinem a polymerace těchto dimerů vede ke vzniku mikrotubulů. Acetylace  $\alpha$ -tubulinu pak vede ke stabilizaci mikrotubulů. Vazba na  $\alpha$ -tubulin a zásadní role HDAC6 v deacetylaci mikrotubulů *in vivo* i *in vitro* byla popsána již 3 roky po objevení HDAC6, tedy v roce 2002 a od té doby se acetylovaný tubulin stal hojně využívaným substrátem pro sledování deacetylačních funkcí HDAC6 (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Haggarty et al., 2003). HDAC6 pro vazbu preferuje volné tubulinové dimery oproti  $\alpha$ -tubulinu vázaném v struktuře mikrotubulu, a to dokonce s 1500násobným rozdílem (Skultetyova et al., 2017).

Kovacs et al., popsali další ze substrátů deacetylačních domén HDAC6 a sice buněčný chaperon Hsp90, jehož funkce je regulována právě acetylací a deacetylací. V buňkách s inhibovanou deacetylací HDAC6 dochází k hyperacetylaci Hsp90 a s tím spojenou disociací od ko-chaperonu

p23. Tato disociace následně vede k produkci defektního glukokortikoidového a androgenního receptoru, a HDAC6 tak potažmo ovlivňuje regulaci transkripce (Kovacs et al., 2005; Seidel et al., 2015).

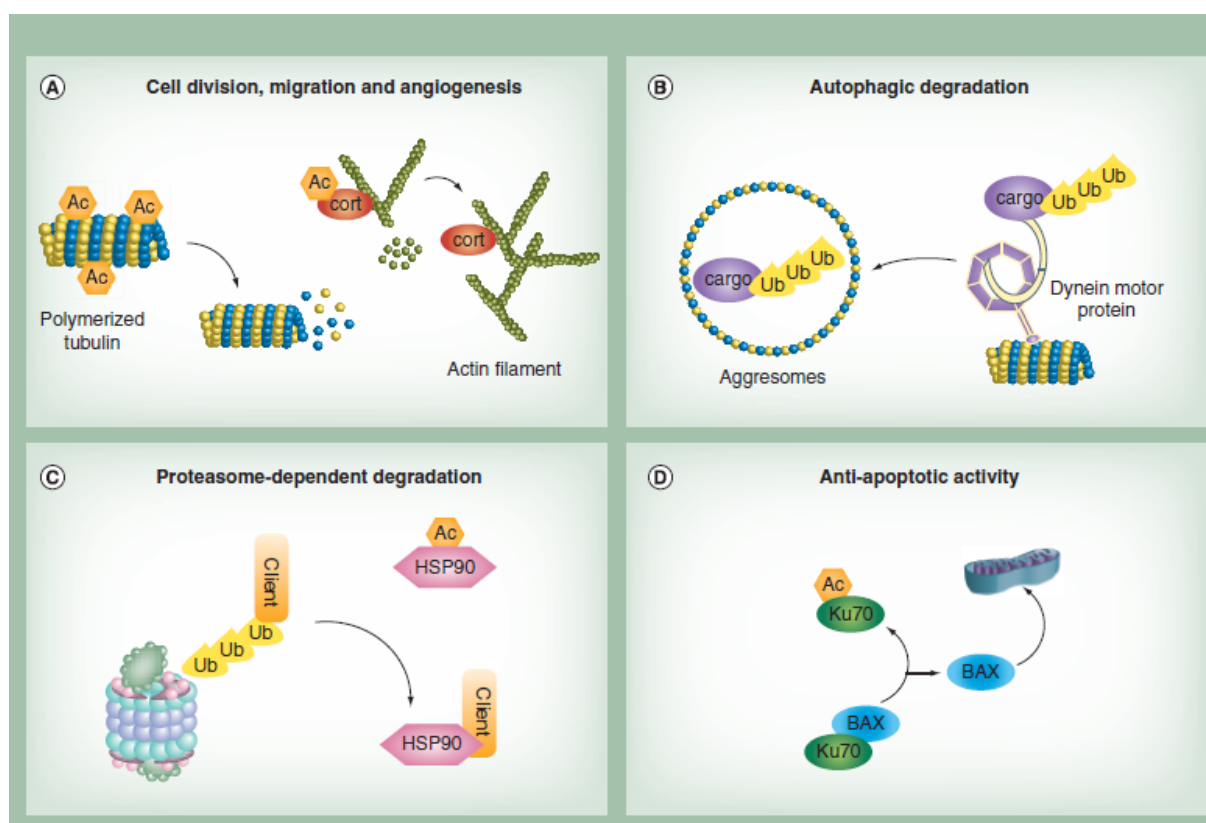
V roce 2016 byl popsán další významný substrát HDAC6, tentokrát se jedná o RIG-I receptor, patřící do skupiny cytosolických RIG-like receptorů, které hrají v imunitním systému zásadní roli v rozeznávání molekulárních motivů asociovaných s patogeny (tzv. PAMP z anglického pathogen associated molecular pattern). RIG-I receptor v cytosolu mimo jiné rozeznává přítomnost virových nukleových kyselin a spouští interferonovou imunitní odpověď I. typu (aktivace například IRF3 či NF- $\kappa$ B). Pro správnou funkci RIG-I je důležitý stav acetylace, kdy v neinfikovaných buňkách najdeme tento protein s acetylovou skupinou na lysinu K858 a K909 a v případě rozeznání molekuly PAMP dochází k deacetylaci těchto lyzinů HDAC6 a spuštění imunitní reakce (Choi et al., 2016; Liu et al., 2016). Podobné spuštění imunitní odpovědi je také prostřednictvím PKC $\alpha$ –HDAC6– $\beta$ -catenin signální dráhy, přirozené imunitní reakce vedoucí ke spuštění antivirové, interferonové imunitní odpovědi (Zhu et al., 2011).

### 2.2.2 Ubiquitin-vazebné funkce

Krátce po objevení HDAC6 byla popsána i její funkce na deacetylaci nezávislá, a sice schopnost vázat ubiquitin. Díky cystein/histidin bohaté ZnF-UBP doméně na C' konci proteinu, HDAC6 váže mono- i poly-ubiquitínované řetězce (Seigneurin-Berny et al., 2001; Hook et al., 2002). U HDAC6 byla dokonce popsána dosud nejvyšší známá afinita pro vazbu ubiquitinu  $K_d=60$  nM. Vysoká afinita k ubiquitinu umožňuje HDAC6 vázat ubiquitínované proteiny dříve, než je rozpoznají ostatní ubiquitin vazebné faktory (Boyault et al., 2007b). Toto privilegium nejrychlejší vazby umožňuje HDAC6 zaujmout významnou roli v metabolismu proteinů a rozhodování o jejich degradaci (obrázek 6).

Pomocí ZnF-UBD domény HDAC6 váže proteiny označené ubiquitínem, tedy špatně sbalené proteiny a proteiny určené k degradaci. HDAC6 poté využívá své vazby na mikrotubuly a dyneinové motory a užívá buněčný cytoskelet k transportu těchto proteinů do míst degradace, ať již se jedná o autofagozomy či proteazomy. Díky mediaci degradace proteinů HDAC6 zabraňuje jejich nadměrnému hromadění v cytoplazmě a případné apoptóze buněk.

Pokud se v cytoplasmě nahromadí větší množství proteinů určených k degradaci, mohou vytvořit inkluzní tělísko, tzv. agregát, které se hůře odbourává v proteazomu. Agregáty svou strukturou připomínají cytoplazmatická inkluzní tělíska, která se vyskytují u řady neurodegenerativních onemocnění, včetně Parkinsonovy choroby. Agregáty jsou pro buňky toxické a není proto divu, že buňky vyvinuly cestu, jak se jich zbavit. K degradaci agregátů dochází v agregozómu, multiproteinovém komplexu, k jehož formaci přispívá HDAC6. Agregozomy vznikají v blízkosti organizačních center mikrotubulů a ke své formaci vyžadují přítomnost mikrotubulů a s nimi asociovaného molekulárního motoru dyneinu. HDAC6 zprostředkovává vazbu ubiquitínovaných proteinů k dyneinu a následný transport po síti mikrotubulů do agregátu. (Kawaguchi et al., 2003)



**Obrázek 6: Příklad funkcí HDAC6.** (A) HDAC 6 ovlivňuje buněčnou migraci, proliferaci a angiogenezi prostřednictvím modulaace cytoskeletu, zejména pak deacetylací  $\alpha$ -tubulinu and kortaktinu. (B) HDAC6 přispívá k tvorbě agregozómu a reguluje transport ubiquitínovaných proteinů do agregozómu. (C) HDAC6 se podílí na degradaci proteinů v proteazómu. (D) HDAC6 brání aktivaci apoptózy prostřednictvím inhibice disociace aktivátoru apoptózy BAX od jeho inhibitoru Ku70. (převzato z Seidel et al., 2015)

### 2.2.3 Role HDAC6 v onkogenezi a virové infekci

Jak již bylo zmíněno, HDAC6 je multifunkčním proteinem, který se účastní řady buněčných procesů, ať již se jedná o formování agregozómu, vazbu a degradaci proteinů či regulaci buněčné motility. Avšak v posledních letech došlo také ke spojení HDAC6 s nadměrnou proliferací, migrací a obecně s výskytem deregulovaných hladin tohoto proteinu v nádorově transformovaných buňkách. Nadměrná exprese HDAC6 v mnoha typech nádorů koreluje s jejich vyšší agresivitou, invazivitou buněk do okolních tkání a celkově s horší prognózou přežití. Nadměrná hladina exprese byla popsána například u agresivního typu rakoviny - akutní myeloidní leukémie, nádoru prsu, nádoru buněk dlaždicového karcinomu či vaječníků (Sakuma et al., 2006; Li et al., 2018). Nicméně změny hladiny exprese se zdají být v případě HDAC6 významné pro průběh rakovinných onemocnění i pokud se jedná o jejich pokles. Například u pacientů s hepatocelulárním karcinomem byla hladina HDAC6 snížena a kolísající hladiny HDAC6 v různých stádiích nemoci se projevily také u lidí s chronickou lymfocytickou leukémií nebo rakovinou prsu. V závislosti na typu nádoru může i snížená exprese HDAC6 vést k horší prognóze (Seidel et al., 2015; Losson et al., 2020).

Naopak u virových infekcí se zdá, že zvýšená exprese HDAC6 vykazuje konstantně spíše antivirové účinky, ačkoliv její vliv na replikační cyklus byl zatím studován jen na několika málo virech, mezi které lze uvést virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV-1) či virus chřipky typu A (IAV) (Zheng et al., 2017). V případě viru HIV-1 nadměrná exprese HDAC6 a s ní spojená vysoká míra deacetylace glykoproteinu g120 vede k inhibici fúze buněčné membrány s obalem HIV virionu a brání vstupu viru do buňky (Valenzuela-Fernández et al., 2005). Pokud se HIV do buněk dostane, HDAC6 jeho úspěšnou replikaci omezuje i v dalších fázích infekce, když interaguje s aktivátorem transkripce, virovým proteinem Tat. HDAC6 Tat protein deacetyluje na pozici lyzinu K-28 a brání tak aktivaci virového promotoru. Při inhibici funkce HDAC6 naopak Tat protein interaguje s cyklinem T1 a virová infekce probíhá lépe (Huo et al., 2011). Infektivitu virového potomstva pak HDAC6 snižuje svou ubiquitin-vazebnou doménou, když tvorbou komplexu HDAC6/APOBEC3G brání proteazomální degradaci proteinu APOBEC3G mediovanou virovým infekčním faktorem Vif. HDAC6 pomocí ZnF-UBD také Vif přímo váže a vede k jeho degradaci v autofagozomu (Valera et al., 2015). Díky interakci s Hsp90 navíc HDAC6 stabilizuje virové produkty a zvyšuje tím šance imunitního systému s infekcí HIV-1 bojovat (Lazaro et al., 2011). Inhibice virové infekce spojená se zvýšenou expresí HDAC6 a vyšší

mírou acetylace existuje také u viru chřipky typu A (IAV). U IAV HDAC6 jednak inhibuje transport virových proteinů podél mikrotubulů a zadruhé deacetylací virového proteinu PA zabraňuje viru v replikaci a transkripci RNA (Husain a Harrod 2011; Husain a Cheung 2014; Chen et al., 2019).

Díky recentním poznatkům o asociaci zvýšené hladiny HDAC6 v buňkách různých typů nádorů, je nasnadě zamýšlet se nad využitím specifických inhibitorů HDAC6 jako potenciálních léků. Nicméně kvůli široké škále funkcí, které v buňkách HDAC6 zastává, je nutné tento protein a jeho interakce stále studovat. Zejména díky poznatkům o antivirových účincích HDAC6 by bylo vhodné se nejprve pokusit detailněji určit význam HDAC6 v replikačním cyklu nejen RNA, ale i DNA virů, u kterých dodnes role HDAC6 nebyla objasněna.



### 3 Cíle práce:

Protein HDAC6 má důležitou roli v řadě buněčných procesů, například zajišťuje deacetylaci řady cytoplazmatických proteinů, umožňuje buněčnou proliferaci a migraci, podílí se na tvorbě agregosomu nebo ovlivňuje metabolismus proteinů díky schopnosti vázat ubiquitin. V rámci několika studií byla zjištěna i role HDAC6 v infekci různými typy virů, jako například HIV či viru chřipky typu A. Nicméně vliv HDAC6 na replikační cyklus DNA virů zůstává rozporuplný. V rámci diplomového projektu byly řešeny dvě hypotézy týkající se interakce buněčného proteinu HDAC6 s virem čeledi *Polyomaviridae*. První pracovní hypotézou je, že HDAC6 reguluje průběh infekce a replikační cyklus polyomavirů. Prvním cílem práce proto bylo:

- Ověřit, zda má protein HDAC6 vliv na infekci buněk polyomaviry.
- Určit vliv inhibice/delece HDAC6 na průběh infekce.
- Určit, která z dvou funkcí HDAC6 se podílí na infekci.
- Porovnat infektivitu virových částic získaných z buněk s delecí genu pro HDAC6 a virových částic získaných z wt buněk.

Druhá hypotéza řešená v rámci diplomového projektu je, že HDAC6 se podílí na nádorové transformaci indukované polyomaviry. Druhým cílem této práce bylo:

- Připravit rekombinantní plazmidy exprimující časné proteiny polyomavirů.
- Připravit lidskou buněčnou linii s deletovaným genem HDAC6 pomocí systému CRISPR/Cas9.

## 4 Materiály a metody:

Experimentální část diplomové práce byla prováděna v BSL 2 laboratoři za přísného dodržování bezpečnosti práce a manipulace s nebezpečným materiálem. Pro práci bylo využíváno laboratorní náčiní a roztoky sterilizované v autoklávu, případně pomocí UV záření. Byly dodržovány zásady aseptické práce. Pro práci s bakteriemi byl využíván bakteriální box a pro práci s tkáňovými kulturami byly využívány laminární boxy. Bakteriální kultury byly kultivovány v termostatu při 37 °C. Misky s pevným médiem byly uchovány dnem vzhůru. Buněčné linie byly kultivovány v termostatu s 5% CO<sub>2</sub> atmosférou nastaveným na 37 °C. Kultivační média pro savčí linie byla vždy před použitím temperována na 37 °C ve vodní lázni.

### 4.1 Média pro buněčné linie:

- **DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma - Aldrich)
- **DMEM se sérem** – Dulbecco's Modified Eagle's Medium, fetální bovinní sérum (FBS) 10% (V/V, Thermo Fisher Scientific)
- **ProxUp** – ProxUp Basal medium (Evercyte); ProxUp Supplements (Evercyte)

### 4.2 Bakteriální média

- **Nutriční LB médium (Sigma-Aldrich)** – pepton 10 g/l; kvasničný autolýzát 5 g/l; NaCl 10 g/l; (pH=7,5)
- **Nutriční LB médium s agarem (Sigma-Aldrich)**– pepton 10 g/l; kvasničný autolýzát 5 g/l; NaCl 10 g/l; agar 15 g/l (pH=7,5)
- **SOC médium** – pepton 20 g/l; kvasničný autolýzát 5 g/l; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 20mM glukóza; 10mM MgSO<sub>4</sub> (pH=7,5); 10mM MgCl<sub>2</sub> (pH=7,5)

### 4.3 Pufry:

- **blokovací pufr pro Western bloty** – 5% odtučněné mléko v PBS
- **blokovací pufr pro imunofluorescence** – 0,25% želatina; 0,25% bovinní sérum albumin v PBS
- **blotovací pufr** – 20% metanol; 25mM Tris; 195mM glycin
- **elektroforetický pufr** – 25mM Tris; 0,192M glycin; 0,1% SDS(w/V); pH=8,3
- **fixační roztok** – 3,7% paraformaldehyd v PBS (w/V)
- **fosfátový PBS** – 140mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- **hemaglutinační pufr** – PBS; 0,2% BSA (V/V)

- **5x Laemmliho pufr** – 5% SDS; 50mM Tris-HCl (pH=6,8); 50%(v/v) glycerol; 25%  $\beta$ -merkaptoethanol; 0,005% (w/v) bromfenolová modř
- **permeabilizační roztok** – 0,5% Triton X 100 v PBS (V/V)
- **pufr B** – 10 mM Tris-HCl (pH=7,4), 150 mM NaCl, 0,01 mM  $\text{CaCl}_2$
- **Restrikční (R) pufr** (10x) – 100 mM Tris-HCl (pH=8,5), 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1M KCl, 1 mg/ml BSA
- **RIPA pufr** – 150mM NaCl; 5mM EDTA; 50mM Tris-HCl (pH=7,4); 0,05% NP-40; 1% deoxycholát sodný; 1% Triton X-100; 0,1% SDS; inhibitory proteáz (Complete protease inhibitor cocktail; Roche)
- **roztok I** – 50mM glukóza; 25mM Tris-HCl (pH=8); 10mM EDTA (pH=8)
- **roztok II** – 1% SDS; 0,2 M NaOH
- **roztok III** – 5M KAc; kyselina octová;  $\text{H}_2\text{O}$
- **TBE pufr** (0,5x) – 45 mM Tris; 45 mM kyselina boritá; 1 mM EDTA (pH ~8,3)
- **TE pufr** – 10mM Tris-HCl (pH 8,0); 1mM EDTA (pH 8,0)

#### 4.4 Buněčné linie:

- **3T6** – adherentně rostoucí buněčná linie myších fibroblastů, odvozená od embryonálních buněk myši (*Mus musculus*); (ATCC; CCL - 96)
- **3T3-wt** – adherentně rostoucí buněčná linie myších fibroblastů, odvozená od embryonálních buněk myši (*Mus musculus*), rodičovská linie pro následující linii:
  - **3T3-HDAC6-KO** – buňky linie 3T3 s deletovaným genem pro HDAC6, rodičovská linie pro následující linie
    - **3T3-WT-r** – buňky linie 3T3-HDAC6-KO s reintrudokovanou expresí HDAC6
    - **3T3-BUZ** – buňky linie 3T3-HDAC6-KO s reintrudokovanou expresí HDAC6 mutované v doméně pro vazbu ubiquitinu
    - **3T3-CD** – buňky linie 3T3-HDAC6-KO s reintrudokovanou expresí HDAC6 mutované v katalytické deacetylační doméně

buňky byly získány od prof. Patricka Matthiase; (Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Basilej (Boyault et al., 2007))

- **RPTEC/hTERT1** – linie lidských ledvinných buněk (buňky renálního proximálního tubulu), odvozená z lidských ledvinných buněk (*Homo sapiens*) a transdukováná

pomocí retrovirového expresního vektoru (pLXSN) nesoucího gen hTERT, (Evercyte, GmbH)

- **293** – buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk immortalizovaných adenovirem

#### 4.5 Viry:

- **MPyV BG strain**

#### 4.6 Bakteriální kmeny

- **Bakteriální kmen *Escherichia coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific)** – F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMSmcrBC*)  $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL*(StrR) *endA1* *nupG*

#### 4.7 Antibiotika (výsledné koncentrace v médiu):

- **ampicilin (Biomedika)** 100  $\mu$ g/ml
- **kanamycin (MP Biomedicals)** 50  $\mu$ g/ml
- **chloramfenikol (Sigma-Aldrich)** 30  $\mu$ g/ml
- **puromycin (Santa Cruz Biotechnology)** 6  $\mu$ g/ml
- **směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma-Aldrich)** - Antibiotics antimycotics solution (100x)

#### 4.8 Inhibitory:

- **tubacin (Sigma-Aldrich)** – zásobní koncentrace 10mM v DMSO
- **inhibitor proteáz** - Complete protease inhibitor cocktail (Roche)
- **definovaný inhibitor trypsinu (Thermo-Fisher Scientific)**

#### 4.9 Enzymy:

- **Q5 polymeráza (New England Biolabs)**
- **restrikční endonukleázy** – EcoRI, EcoRV, HindIII, NdeI
- **ribonukleáza A (Thermo Fisher Scientific)**
- **T4 DNA ligáza (Thermo Fisher Scientific)**
- **trypsin** – roztok 0,25% trypsinu v PBS
- **trypsin ve versenu (Thermo-Fisher Scientific)** – 0,05% trypsin v 0,2% EDTA v PBS

#### 4.10 Protilátky:

- **MαAT (Sigma-Aldrich)** – myší primární protilátka proti acetylovanému tubulinu, ředění 1000x
- **MαVP1 (Forstová et al., 1993)** – myší primární protilátka proti proteinu VP1, ředění 100x
- **RtαLT (Dilworth a Griffin, 1982)** – krysí monoklonální primární protilátka proti velkému T antigenu myšího polyomaviru, ředění 50 x
- **MαLT SV40 (Abcam)** – myší monoklonální protilátka (klon 416) rozeznávající LT antigen viru SV40 a krosreagující s LT antigenem BK viru, ředění 100x
- **RbαGAPDH (Sigma-Aldrich)** – králičí polyklonální primární protilátka proti GAPDH, ředění 5000 x
- **GαM-Px (BioRad Laboratories)** – kozí polyklonální sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou proti myším imunoglobulinům, ředění 1000 x
- **GαRt-Px (Santa Cruz Biotechnology)** – kozí sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou proti krysím imunoglobulinům, ředění 1000x
- **GαRb-Px (BioRad Laboratories)** – kozí sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou proti králičím imunoglobulinům, ředění 1000x
- **GαRb-Cy3 (Life Technologies)** – kozí polyklonální sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům IgG konjugovaná s Cy3, ředění 1000x
- **GαRt-AF 488 (Life Technologies)** – kozí sekundární monoklonální protilátka proti krysím imunoglobulinům IgG konjugovaná s AlexaFluor 488, ředění 1000x

#### 4.11 Markery molekulových vah a barviva:

- **GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)** – marker molekulových vah používaný pro určení délky fragmentů DNA při agarózové DNA elektroforéze
- **Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-245 kDa) (New England BioLabs)** – proteinový standard pro určení molekulové hmotnosti proteinů při SDS-PAGE, imunoblotu a imunodetekci proteinů na membráně
- **GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium)** – barvivo pro značení DNA při agarózové DNA elektroforéze, ředění 20 000x
- **Midori Green Advance DNA Stain** – barvivo pro značení DNA při agarózové DNA elektroforéze

- **DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole)** – fluorescenční barva využívaná pro značení DNA při imunofluorescenční mikroskopii, 2 µg/ml v 50% glycerolu

#### 4.12 Primery:

- BKPyV-EARLY-F (20 basí):
- 5'-CAA AAT GCT TTA AAC AGG TG-3'
- BKPyV-EARLY-R (24 basí):
- 5'-CAC CAT GGA TAA AGT TCT TAA CAG-3'
- MPyV-EARLY-F (24 basí):
- 5'-CAC CAT GGA TAG AGT TCT GAG CAG-3'
- MPyV-EARLY-R (19 basí):
- 5'-GAT ATG ACG CGC TAT GTT G-3'

#### 4.13 Plazmidy:

- **pMJG** – plazmid pMJ1 nesoucí kompletní genom MPyV (Krauzewicz et al., 1990)
- **pEF-DEST-51 (Thermo-Fisher Scientific)** – akceptorový vektor pro klonování pomocí LR rekombinace in vitro. Obsahuje attR1 a attR2 místa, která umožňují vložení genu našeho zájmu z donorového vektoru pomocí rekombinace. Vložený gen je pod kontrolou silného eukaryotického promotoru E1a.
- **Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Double Nickase Plasmid (h) (Santa Cruz Biotechnology)** – set 2 plazmidů, každý kóduje sekvenci pro D10A mutantu Cas9 nukleázy a 20 nt dlouhou guide RNA specifickou k cílové DNA sekvenci. Guide RNA jsou navrženy tak, aby cílily Cas9 protein k cílové sekvenci DNA a iniciovaly vytvoření dvouřetězcového zlomu v cílové DNA. Jeden z páru plazmidů obsahuje sekvenci GFP pro vizuální kontrolu efektivity transfekce a druhý plazmid obsahuje gen pro puromycinovou rezistenci umožňující následnou selekci.
- **Control Double Nickase plasmid (Santa Cruz Biotechnology)** – kontrolní plazmid pro delecí genů CRISPR/Cas systémem. Set 2 plazmidů, každý kóduje sekvenci pro D10A mutantu Cas9 nukleázy a 20 nt dlouhou guide RNA, která není specifická pro žádnou sekvenci v lidském genomu. Jeden z páru plazmidů obsahuje sekvenci GFP pro vizuální kontrolu efektivity transfekce a druhý plazmid obsahuje gen pro puromycinovou rezistenci umožňující následnou selekci.

- **pENTR™/D-TOPO® (Thermo-Fisher Scientific)** – Donorový plazmid pro klonování pomocí LR rekombinace *in vitro*. Plazmid nese kanamycinovou rezistenci. Oblast nesoucí geny našeho zájmu je ohraničena attL1 a attL2 sekvencemi, jež umožňují rekombinaci s attR1 a attR2 sekvencemi v akceptorovém plazmidovém vektoru. Rekombinace donorového a cílového plazmidu je zajištěna komerční směsí enzymů LR clonase II mix.

#### 4.14 Transfekční činidla

- **UltraCruz® Transfection Reagent (Santa Cruz Technology)**
- **Turbofect (Thermo Fisher Scientific)**

#### 4.15 Komerční soupravy:

##### Kit pro izolaci DNA

- **GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)**

##### Kity pro purifikaci DNA

- **High Pure Purification Kit (Roche)**

##### Kity pro klonování

- **pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit, with One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fisher Scientific):** pro vkládání inzertů přímým klonováním pomocí topoisomerázy
- **Gateway™ LR Clonase™ II enzyme mix (Thermo Fisher Scientific):** pro *in vitro* LR rekombinaci mezi attL a attR místy vektorů

#### 4.16 Práce s viry:

##### 4.16.1 Izolace viru MPyV

Buňky linie 3T6 byly vysety na Petriho misky (Ø 10 cm; celkem 10 misek) tak, aby druhý den dosáhly 20-25% konfluence a kultivovány 24 hodin v termostatu. Druhý den bylo z misek odebráno médium a buňky byly opláchnuty 2 ml DMEM média. Virové inokulum bylo naředěno v DMEM médiu tak, aby buňky byly infikovány s multiplicitou infekce (MOI) = 0,05 – 0,01 pfu/b a 1 ml takto naředěné virové suspenze přeneseno na Petriho misku. Buňky byly inkubovány v termostatu, po 30 minutách byla suspenze v Petriho misce promíchána a po 1 hodině byla suspenze doplněna 9 ml DMEM média se sérem a směsí antibiotik. Buňky byly

kultivovány v termostatu při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>, dokud se nezačal masivně projevovat cytopatický efekt (5-7 dní).

Pro uvolnění viru z buněk byly Petriho misky s infikovanými buňkami 3x zmraženy v -20 °C a opět rozmraženy při pokojové teplotě. Po třetím rozmražení byly buňky seškrabány ze dna misky pomocí gumové stěrky a celý objem suspenze přenesen do 50ml centrifugační zkumavky. Suspenze byla centrifugována 40 minut/4 °C/4000 g. Supernatant byl odebrán a uložen v 4 °C. Buněčný pelet byl resuspendován v 10 ml 10mM Tris-HCl (pH=7,4) a homogenizován v Potter-Elvehjem homogenizátoru. Homogenní suspenze byla přenesena do centrifugační zkumavky, k suspenzi byla přidána neuraminidáza (finální koncentrace 0,01 U/ml) a aprotinin (finální koncentrace 2 µg/ml) a směs byla inkubována přes noc při laboratorní teplotě. Poté byl homogenát centrifugován 40 minut/4 °C/4000 g, supernatant přidán k předchozímu a uchován při 4 °C a pelet byl resuspendován v 1 ml 10 mM Tris-Cl (pH 9). Suspenze byla inkubována 4h při laboratorní teplotě a poté znovu centrifugována 40 minut/4 °C/4000 g. Supernatant byl smíchán se supernatanty uloženými z předchozích centrifugací a pelet vyhozen.

Spojené supernatanty byly rozděleny do ultracentrifugačních zkumavek, podvrstveny 10% roztokem (w/V) sacharózy v pufru B a zkumavky byly vyváženy na stejnou hmotnost pufrům B. Virová suspenze byla centrifugována při 150 000 g/4 °C/3 hodiny. Virus, nacházející se v peletu, byl na ledu resuspendován v 200 – 500 µl pufru B.

#### 4.16.2 Přečištění viru v CsCl gradientu

Ultracentrifugační zkumavka s homogenní virovou suspenzí byla doplněna do 7,9 g pufrům B a bylo přidáno 3,79 g CsCl. Refraktometrem byla změřena hustota suspenze, která měla vykazovat refraktometrický index v rozmezí 1,363 – 1,365. Suspenze byla převrstvena parafinovým olejem a zkumavky byly centrifugovány při 150 000 g/18 °C/24 hodin. Pomocí injekční jehly byla z ultracentrifugační zkumavky odsáta frakce obsahující virové částice (viditelný opaleskující pruh nacházející se v polovině délky zkumavky). Tato frakce byla přes noc dialyzována proti pufru B při 4 °C. Dialyzovaná virová suspenze byla rozdělena do mikrozkušavek po 50-100 µl. Alikvoty viru byly uskladněny v -80 °C. Z nově získané virové suspenze byl stanoven virový titr.



#### 4.16.3 Stanovení virového titru

Myší fibroblasty 3T6 narostlé na mikroskopických sklíčkách v 24 jamkové destičce byly infikovány 200  $\mu$ l naředěné virové suspenze (ředění  $10^{-2} - 10^{-6}$ ) a po 24 hodinách byly detekovány buňky pozitivní na virový LT antigen metodou nepřímé imunofluorescence. V zorném poli fluorescenčního mikroskopu byly spočítány pozitivní buňky. Byly spočítány pozitivní buňky z 20 zorných polí a z počtu buněk pozitivních na přítomnost LT antigenu byl stanoven titr infekčních virových částic podle vzorce  $T = N \times f \times \frac{1}{d} \times v$  [ffu/ml], kde:

- N ... průměrný počet pozitivních buněk v zorném poli
- f ... faktor přepočtu (plocha jamky 24 jamkové destičky/ plochou zorného pole)
- d ... výchozí ředění virové suspenze
- v ... násobek naneseného virového inokula do 1 ml (pro 200  $\mu$ l  $v = 5$ )

#### 4.16.4 Hemaglutinační test

Do jamek 96 jamkové destičky (dno ve tvaru písmene U) bylo nanášeno 50  $\mu$ l hemaglutinačního pufru. 5  $\mu$ l virové suspenze bylo v mikrozkuhavce naředěno do 45  $\mu$ l hemaglutinačního pufru. Do první jamky v řadě byl přidán 50  $\mu$ l naředěné virové suspenze, objem jamky byl promíchán špičkou pipety a 50  $\mu$ l suspenze přeneseno do vedlejší jamky v řadě. Tímto způsobem byla vytvořena ředící řada. Do poslední jamky v řadě bylo nanášeno 50  $\mu$ l pufru B sloužícího jako negativní kontrola. Do všech jamek bylo přidáno 50  $\mu$ l roztoku 0,4% červených krvinek v hemaglutinačním pufru. Směs byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po 1 hodině byl odečten hemaglutinační titr – stav aglutinace v ředící řadě. Jamka, v níž jako poslední došlo k aglutinaci viru s krvinkami a příslušné ředění viru byly použity pro výpočet virového titru.

Pro výpočet virového titru byl použit vzorec  $T = D \times 2^{n+1} \times 20$  [HUA/ml], kde:

- D ... počáteční ředění virové suspenze (v tomto případě 10 x)
- n ... pořadí poslední jamky, kde virus aglutinoval krvinky

Virový titr byl stanoven v hemaglutinačních jednotkách na 1 ml (HUA/ml). Díky empirickým měřením je známo, že jedna hemaglutinační jednotka obsahuje  $10^7$  virových částic (Horníková et al., 2015).

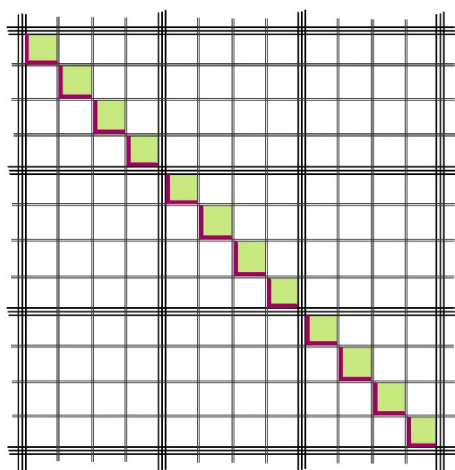
## 4.17 Práce s tkáňovými kulturami

### 4.17.1 Pasážování buněk linie 3T6, 3T3 a 293

Z Petriho misky (Ø 6 cm) s konfluentně narostlou buněčnou linií bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty 1 ml versenu. K buňkám bylo přidáno 300 µl trypsinu a byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 5 minut. Po 5 minutách byl trypsin inaktivován přidáním 5 ml média DMEM se sérem předem temperovaného ve vodní lázni na 37 °C. Buňky byly v médiu resuspendovány několikanásobným natažením do sterilní pipety a vypuštěním oproti stěně misky. Buněčná suspenze byla přenesena na čistou Petriho misku (Ø 6 cm) s médiem DMEM se sérem v poměru 1:4–1:10. Buňky byly kultivovány v termostatu při 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře.

### 4.17.2 Stanovení počtu buněk pomocí Bürkerovy komůrky

Pro stanovení počtu buněk v suspenzi byla využívána Bürkerova počítací komůrka. Na podložní sklo s výbrusem bylo upevněno krycí sklo. Z buněk ošetřených trypsinem a resuspendovaných v médiu bylo odebráno 100 µl suspenze. Suspenze byla pipetou přenesena do výbrusu v podložním skle, aby se rovnoměrně rozprostřela do Bürkerovy počítací komůrky. Počítací komůrka byla vložena do světelného mikroskopu, ve kterém byly spočítány buňky. Bürkerova komůrka je rozdělena do dvou čtvercových počítacích polí, z nichž každý obsahuje 9 větších čtverců, které jsou dále rozděleny do 16 menších čtverců. Při stanovení počtu buněk bylo vždy spočítáno 12 těchto malých čtverců v diagonálním směru celého počítacího pole. Do počtu byly zahrnovány i buňky ležící na levé a dolní hraně každého čtverce – ve tvaru písmene L (obrázek 7). Byly spočítány obě pole umístěné na podložním skle, celkem tedy 24 čtverců. Napočítané buňky byly vyděleny počtem čtverců, a tak získán průměrný počet buněk na čtverec ( $n$ ). Počet buněk v suspenzi ( $N$ ) byl stanoven použitím výpočtu  $N = n \cdot 2,5 \cdot 10^5$  buněk/ml.



**Obrázek 7: Schéma Bürknerovy počítací komůrky.**

#### 4.17.3 Kultivace myších fibroblastů na mikroskopických sklech

Do 24 jamkové destičky byla pinzetou přenesena kruhová krycí sklíčka sterilizovaná ponořením do etanolu a následným protažením skrz plamen. Z Petriho misky (Ø 6 cm) s narostlými buňkami (přibližně 70% konfluence) bylo odebráno médium, buňky byly opláchnuty 1 ml versenu a 5 minut inkubovány s 300 µl trypsinu v termostatu při 37 °C. Poté byly buňky resuspendovány v 5 ml DMEM média se sérem. Počet buněk v suspenzi byl stanoven pomocí Bürknerovy počítací komůrky a požadované množství buněk bylo naneseno do jamek 24 jamkové destičky s předem připravenými sklíčky. Buněčná suspenze byla doplněna do 1 ml ohřátým médiem DMEM se sérem a kultivována v termostatu s 5% CO<sub>2</sub> atmosférou a 37 °C do druhého dne.

#### 4.17.4 Ošetření buněk 3T6 tubacinem

Pro určení vlivu HDAC6 na schopnost MPyV vyvolat infekci byly buňky 3T6 ošetřeny specifickým inhibitorem HDAC6 tubacinem v různých časech po infekci.

V mikrozkuhavce bylo smícháno 10 µl tubacinu (10 mM) s 990 µl příslušného média. Z tohoto roztoku tubacinu (10 µM) byly v mikrozkuhavkách připraveny roztoky tubacinu v 2,5µM a 5µM koncentraci. Z jamek 24 jamkové kultivační destičky se narostlými buňkami 3T6 (přibližně 50% konfluence) bylo odsáto médium a buňky byly infikovány MPyV tak, aby MOI=0,3 pfu/b. Tubacin v koncentraci 2,5µM a 5µM byl k buňkám přidán:

- I. zároveň s infekcí,

- II. 3 hodiny po infekci,
- III. 6 hodin po infekci, nebo
- IV. 24 hodin po infekci.

Buňky byly s inhibitorem inkubovány 24h. Poté byly buňky fixovány a byly detekovány buňky pozitivní na virový LT antigen metodou nepřímé imunofluorescence. Pomocí fluorescenčního mikroskopu byly spočítány pozitivní buňky z 30 zorných polí a průměrné množství LT pozitivních buněk u ošetřených buněk bylo porovnáno s množstvím LT pozitivních buněk u kontrolních (neošetřených) buněk.

#### 4.17.5 Infekce buněčných linií 3T3 a 3T6

Buňky byly pasážovány tak, aby v den infekce dosáhly 50-60% konfluence. Z jamek 24 jamkové kultivační destičky s narostlými buňkami bylo odstraněno médium a buňky byly opláchnuty 1 ml ohřátého DMEM média. V mikrozkuhavce byl naředěn do 200  $\mu$ l DMEM média MPyV tak, aby moi=0,2-0,3 pfu/b (vliv tubacinu na replikační cyklus viru) nebo moi=1 pfu/b (rozdíl v replikaci MPyV mezi wt buňkami a mutantními liniemi). Virová suspenze byla přidána k buňkám a buňky byly inkubovány 1 h v termostatu při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Poté byl objem doplněn do 1 ml DMEM médiem se sérem a buňky byly kultivovány v termostatu s 5% CO<sub>2</sub> atmosférou a 37 °C.

Obdobně byly infikovány i buňky narostlé na 6 jamkové destičce. Nanesené objemy byly upraveny tak, že do jamek bylo naneseno 400  $\mu$ l virové suspenze a po 1 hodině byl celkový objem doplněn sérovým médiem do 2 ml. V tomto případě byly buňky infikovány s moi=10 pfu/b.

#### 4.17.6 Pasážování lidských ledvinných buněk RPTEC/hTERT1

Z kultivační láhve s narostlými buňkami (90-95% konfluence) bylo odebráno médium a buňky byly opláchnuty 5 ml versenu. K buňkám bylo přidáno 1,5 ml trypsinu ve versenu a byly inkubovány v termostatu při 37 °C. Po 5 minutách byl trypsin inaktivován přidáním 1,5 ml definovaného inhibitoru trypsinu (DTI) a byly tímto roztokem uvolněny ze stěn láhve. Uvolněné buňky byly přeneseny do centrifugační zkuševky promíchány se 3 ml média ProxUp. Buněčná suspenze byla centrifugována při 750 g/4 °C/5 minut. Buněčný pelet byl resuspendován v 10 ml ProxUp média. Suspenze byla rozdělena do dvou kultivačních láhví. Buňky byly kultivovány v termostatu při 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře.

#### 4.17.7 Stanovení efektivní inhibiční koncentrace tubacinu

V mikrozkuhavce bylo smícháno 10  $\mu$ l tubacinu (10 mM) s 990  $\mu$ l příslušného média. Pro buňky 3T6 se jednalo o médium DMEM se sérem, v případě buněk RPTEC/TERT1 bylo použito médium ProxUp. Ze zásobního roztoku tubacinu (10  $\mu$ M) byly v mikrozkuhavkách připraveny další ředění. Z jamek 24 jamkové kultivační destičky s narostlými buňkami 3T6 nebo RPTEC/hTERT1 bylo odstraněno médium. Do jamek byl přidán 1 ml příslušného média s různými tubacinem v koncentraci 0,5  $\mu$ M; 1,25  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ M; 5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M a buňky byly inkubovány v termostatu s 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> atmosférou. Z buněk byly po 24h a 48h inkubaci připraveny lyzáty. Lyzáty byly separovány SDS elektroforézou, separované proteiny byly přeneseny na membránu a proteiny GAPDH a acetylovaný tubulin byly označeny specifickými protilátkami. Intenzita signálu jednotlivých pruhů proteinů byla měřena Amersham™ Imager 600 RGB software a normalizována na hladinu exprese GAPDH.

#### 4.17.8 Stanovení citlivosti buněk RPTEC/hTERT1 na puromycin

V 15 ml falkoně bylo smícháno 2,5  $\mu$ l puromycinu (10mg/ml) s 2,5 ml ProxUp média. Z tohoto zásobního roztoku (10  $\mu$ l/ml) byly do mikrozkuhovek podle tabulky připraveny další ředění na požadovanou výslednou koncentraci. Z jamek 24 jamkové kultivační destičky s narostlými buňkami RPTEC/hTERT1 bylo odstraněno médium. Do jamek bylo přidáno 1 ml ProxUp média s různými koncentracemi puromycinu – 0,5; 1, 2, 3, 4, 6, 8  $\mu$ g/ml. Buňky byly inkubovány 5 dní v termostatu s 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> atmosférou a jejich stav byl každý den průběžně kontrolován pod mikroskopem. Po 5 dnech byla vybrána nejnižší koncentrace puromycinu, při níž nepřežily žádné buňky. Stanovená koncentrace byla použita pro následnou selekci transfekovaných buněk.

#### 4.17.9 Optimalizace transfekce buněk RPTEC/hTERT1 transfekčním činidlem UltraCruz Transfection Reagent

Schopnost transfekce buněk RPTEC/TERT1 pomocí komerční soupravy byla ověřena s použitím kontrolního plazmidu CTRL nesoucího GFP. Zároveň byly transfekční reakce provedeny v několika pokusech, pro zjištění ideálních poměrů reakčních složek k dosažení co nejvyšší úspěšnosti transfekce a co nejnižších toxických vlivů transfekčních reagens.

Z jamek 6 jamkové destičky s narostlými buňkami RPTEC/TERT1 (přibližně 70% konfluence) bylo odsáto médium staré kultivační medium a do každé jamky bylo přidáno 3 ml čerstvého

média. Dle tabulky č.1 byl připraven transfekční roztok A s různými koncentracemi DNA z (kontrolního plazmidu kódující EGFP protein) a roztok B (tabulka č.2). Oba roztoky byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě, poté smíchány dohromady a inkubovány 20 min při pokojové teplotě. Transfekční směs byla přenesena po 300 µl k buňkám 6 jamkové destičky. Suspenze byla promíchána jemným krouživým pohybem destičky a buňky byly kultivovány v termostatu při 37 °C 72 hodin, přičemž po 48 hodinách bylo médium vyměněno za 3 ml čerstvého ProxUp média. Po 72 hodinách byly detekovány buňky pozitivní na EGFP a byla stanovena efektivita transfekce.

Transfekční roztok A			
Reakční složky	1 µg pDNA	2 µg pDNA	3 µg pDNA
pDNA (c=1,9 µg/µl)	0,53 µl	1,05 µl	1,58 µl
Plasmid Transfection Medium	149,47 µl	148,95 µl	148,42 µl
celkový objem	150 µl	150 µl	150 µl

Tabulka 1: Složení transfekčního roztoku A.

Transfekční roztok B	
UltraCruz® Transfection Reagent	10 µl
Plasmid Transfection Medium	140 µl
celkový objem	150 µl

Tabulka 2: Složení transfekčního roztoku B.

#### 4.17.10 Delece genu HDAC6 z buněk RPTEC/hTERT1 systémem CRISPR/Cas9

Do jamek 6 jamkové destičky bylo vyseto  $2 \times 10^5$  buněk RPTEC/hTERT1.

Druhý den bylo růstové médium vyměněno za 3 ml čerstvého ProxUp média. Podle tabulky č.3 byl připraven transfekční roztok A s 1 µg DNA (Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Double Nickase (h) plazmid nebo kontrolní Control Double Nickase plazmid) a transfekční roztok B. Roztoky byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě, smíchány dohromady a inkubovány 20 min při laboratorní teplotě. K buňkám 6 jamkové destičky bylo přidáno 300 µl transfekční směsi, suspenze byla promíchána jemným krouživým pohybem destičky a buňky byly kultivovány v termostatu při 37 °C. Po 24 hodinách byla ověřena úspěšnost transfekce detekcí

exprese proteinu GFP pomocí fluorescenčního mikroskopu. Po 48 hodinách bylo z buněk odebráno médium a buňky byly selektovány 5 dní médiem s puromycinem (6 µg/ml), přičemž každých 24 hodin bylo selekční médium vyměněno za 3 ml čerstvého ProxUp média s puromycinem. Selektované kolonie byly rozpěstovány a úspěšnost delece genu HDAC6 byla testována ověřováním přítomnosti proteinu metodou Western Blot.

Transfekční roztok		
reakční složky	A	B
1 µg pDNA (c=0,2 µg/µl)	5,0 µl	
Plasmid Transfection Medium	149,47 µl	140 µl
UltraCruz® Transfection Reagent		10 µl
celkový objem	150 µl	150 µl

Tabulka 3: Složení transfekčních roztoků.

#### 4.17.11 Transfekce buněk 293

Myší ledvinné buňky 293 byly vysety na 24 jamkovou destičku v koncentraci  $2 \cdot 10^5$  buněk na jamku. Druhý den byla připravena transfekční směs - 0,5µg DNA bylo smícháno se 100 µl DMEM média, směs byla promíchána a následně byly přidány 2 µl TurboFect Transfection Reagent. Směs byla inkubována 20 min při laboratorní teplotě. Poté bylo k buňkám přeneseno 100 µl transfekční směsi a transfekční směs byla promíchána s kultivačním médiem. Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO<sub>2</sub>.

#### 4.18 Práce s proteiny

##### 4.18.1 Příprava buněčných lyzátů

Z buněk bylo odstraněno médium a buňky byly opláchnuty 1 ml PBS. K buňkám bylo přidáno 200 µl RIPA pufru. Sterilní stěrkou byla suspenze důkladně setřena ze dna jamky a přenesena do 1,5 ml mikrozkušavky. Mikrozkušavka byla inkubována 20 minut na ledu a poté byl lyzát centrifugován 20 minut při 4 °C a 20 000 g. Supernatant byl přenesen do čisté mikrozkušavky. Buněčný lyzát byl buď ihned použit pro SDS elektroforézu, nebo skladován při -20 °C pro další použití.

##### 4.18.2 Příprava vzorků na SDS proteinovou elektroforézu

K 45 µl buněčného lyzátu bylo přidáno 5 µl 5x Laemmliho pufru. Směs byla promíchána a 5 minut denaturována při 100 °C. Zchladlé vzorky byly buď ihned naneseny do gelu pro proteinovou elektroforézu, nebo uchovány při -20 °C.

#### 4.18.3 SDS – proteinová elektroforéza

Pro účely experimentů prováděných v této práci byly proteiny separovány v 10% separačním gelu a 5% zaostřovacím gelu. Složení obou gelů je uvedeno v tabulce 4.

Dle tabulky 1 byl připraven roztok pro separační gel, přičemž jednotlivé složky byly přidány ve stejném pořadí, v jakém jsou uvedeny. Roztok byl nanesen do předem připravených upevněných skel (součást elektroforetické aparatury) a převrstven izobutanolem syčeným vodou. Po 30 minutách polymerace byl izobutanol odstraněn.

Zaostřovací gel byl připraven dle tabulky 1 a nalit na gel separační. Ihned po nalití gelu byl vložen hřeben kvůli vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Po 20 minutách polymerace byl opatrně vyjmut hřeben, skla s gely vloženy do elektroforetické aparatury a přelity elektroforetickým pufrem a jamky pufrem propláchnuty. Do jamek bylo naneseno 5-15  $\mu$ l vzorků a pro určení molekulových hmotností separovaných proteinů proteinový standart.

Pro zaostření proteinů bylo použito konstantní napětí 80 V po dobu 30 minut. Následně byly proteiny separovány při konstantním napětí 140 V zhruba 2 hodiny, do doby, než bromfenolová modř z Laemmliho pufru ve vzorcích doputovala asi 1 cm od spodního okraje gelu.

Složení gelů		
složka	10%	5%
1M Tris-HCl (pH=8,8) (ml)	4,500	
1M Tris-HCl (pH=6,8) (ml)		
akrylamid/bisakrylamid roztok 29:1 (30%) (ml)	4,000	1,000
10% SDS (ml)	0,120	0,060
demi H2O (ml)	3,250	4,220
10% amonium persulfát (μl)	90	40
TEMED (μl)	8,5	10
celkový objem	12 ml	6 ml

Tabulka 4: Složení elektroforetických gelů.

#### 4.18.4 WESTERN blot

Po ukončení SDS elektroforézy byla aparatura rozebrána a gel opatrně přenesen ze skla do vychlazeného blotovacího pufru. Poté byl v blotovacím pufru opatrně sestaven blotovací sendvič skládající se ze 4 vrstev filtračního papíru, 1 vrstvy filtračního papíru Whatman, polyakrylamidového gelu, nitrocelulózové membrány, filtračního papíru Whatman a 4 vrstev filtračního papíru. Sendvič byl umístěn do blotovací aparatury a zalit blotovacím pufrem.



Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu probíhal za konstantního proudu 250 mA po dobu 90 minut.

#### 4.18.5 Imunodetekce proteinů na membráně

Nitrocelulózová membrána byla přenesena do misky s blokovacím pufrém pro western blot a inkubována 45 min. Membrána byla inkubována s primární protilátkou naředěnou v blokačním pufru 1 hodinu. Po inkubaci byla membrána 3x promyta v PBS po dobu 10 minut. Poté byla membrána inkubována 30 minut s příslušnou sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou naředěnou v blokačním roztoku a poté opět 3x promyta v PBS. Navázána protilátka na membránu byla vyvolána soupravou Super Signal West Femto Maximum sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) a signál byl detekován přístrojem Amersham™ Imager 600 RGB (GE Healthcare). Intenzita signálu jednotlivých pruhů proteinů byla měřena Amersham™ Imager 600 RGB software (GE Healthcare) a normalizována na hladinu exprese GAPDH (pokud není uvedeno jinak).

V případě potřeby byl signál navázané protilátky na membránu „zhasnut“ a membrána byla použita k detekci jiného proteinu. Křenová peroxidáza navázaná na membránu byla deaktivována inkubací v 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po dobu 15 minut při teplotě 37 °C. Membrána byla následně promyta při pokojové teplotě 15 minut v H<sub>2</sub>O, 15 minut v PBS a 30 minut byla blokována v blokačním roztoku s mlékem. Následovala imunodetekce zvoleného proteinu primární a sekundární protilátkou.

#### 4.18.6 Nepřímá imunofluorescence

Z infikovaných nebo transfekovaných buněk nasazených na 24 jamkové destičky bylo odsáto médium. Buňky byly 15 minut fixovány v 500 µl fixačního roztoku, který byl poté odstraněn. Bylo přidáno 500 µl permeabilizačního roztoku, buňky byly inkubovány 5 minut a poté 3x propláchnuty 1 ml PBS. Buňky byly inkubovány v 1 ml blokačního roztoku pro imunofluorescenci po dobu 30 minut. Blokační roztok byl odstraněn, nahrazen 220 µl naředěné primární protilátky v blokačním roztoku a buňky byly inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě. Po dokončení inkubace byly buňky 3x promyty 1 ml PBS po dobu 10 minut. Do jamek bylo nanášeno 220 µl sekundární protilátky naředěné v blokačním roztoku a buňky byly inkubovány 30 minut. Od kroku přidání sekundární protilátky byla destička chráněna před světlem. Buňky byly opět 3x promyty inkubací v 1 ml PBS po dobu 10 minut. Po třetím promytí

bylo přidáno 500  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Sklíčka byly opatrně vyjmuty z jamek pomocí špičky pipety a pinzety, položeny na filtrační papír stranou s buňkami nahoru a ponechány na vzduchu několik minut, dokud neoschly. Po oschnutí byla sklíčka montována stranou s narostlými buňkami do kapky (4,5  $\mu$ l) 50% glycerolu s DAPI. Vzorky byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX71.

#### 4.19 Práce s bakteriemi

##### 4.19.1 Kultivace bakterií v tekutém médiu

Do příslušného objemu kultivačního média byla pomocí sterilního párátko inokulována monokolonie pocházející buď z kultivační misky s pevným médiem nebo z bakteriální konzervy. V případě kolonií určených pro minipreparaci rekombinantních plazmidů alkalickou metodou byly monokolonie zaočkovány do mikrozkuřavky se 700  $\mu$ l nutričního LB média se selekčním antibiotikem. Pro izolaci plazmidové DNA pomocí komerční soupravy GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit byly monokolonie inokulovány do Erlenmeyerovy baňky s 5 ml nutričního LB média se selekčním antibiotikem. Buňky byly inkubovány v orbitálním inkubátoru 16-20 h při 37 °C a 150 rpm.

##### 4.19.2 Kultivace bakterií na pevném médiu

Na kultivační plotny s pevným médiem a požadovaným antibiotikem byla pipetou asepticky přenesena tekutá bakteriální kultura, která byla po celém povrchu média rozetřena pomocí sterilní roztěrky. Bakterie byly inkubovány 12-16 hodin v termostatu při 37 °C a dnem misky vzhůru.

##### 4.19.3 Příprava bakteriálních konzerv

Bakteriální kolonie nesoucí požadovaný plazmid byly přeneseny do 5 ml živného LB média s příslušným antibiotikem a inkubovány v orbitálním inkubátoru při 150 rpm a 37 °C přes noc. Druhý den byly z narostlé bakteriální kultury připraveny konzervy pro dlouhodobé uchování tak, že do mikrozkuřavky bylo přeneseno 400  $\mu$ l bakteriální kultury a 400  $\mu$ l 40% (V/V) roztoku glycerolu. Takto připravená suspenze byla ihned zmrazena na -80 °C a uchována pro další použití.

#### 4.19.4 Izolace plazmidové DNA – GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)

5 ml bakteriální kultury (*E. coli*) narostlé přes noc v orbitálním inkubátoru při 37 °C a 150 rpm bylo centrifugováno po dobu 1 minuty při 12 000 g. Supernatant byl odstraněn. S buněčným peletem bylo dále nakládáno dle návodu výrobce ke komerční soupravě GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). DNA získaná dle postupu uvedeném v návodu byla vždy vyvázána z izolační kolonky do 100 µl elučního pufru, který byl taktéž součástí soupravy. Izolovaná DNA byla následně uložena při -20 °C či ihned použita k dalším pokusům.

#### 4.19.5 Měření koncentrace izolované DNA

Izolovaná DNA byla změřena na přístroji Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) dle návodu výrobce a kvalita i koncentrace izolované DNA byla vyhodnocena v příslušném softwaru.

#### 4.19.6 Sekvenace

Veškeré sekvenace byly prováděny sekční Laboratoří Sekvenace DNA, PŘF UK, BIOCEV, Průmyslová 595, Vestec.

#### 4.19.7 DNA elektroforéza

Metoda DNA elektroforézy byla využívána ke kontrole efektivity štěpení, ligace, amplifikace a izolace DNA byla používána DNA elektroforéza. Byl využíván 1% agarózový gel (w/V) v 0,5x TBE pufru. Nukleové kyseliny byly značeny interkalační barvou GelRed Nucleic Acid Stain, respektive Midori Green Advance DNA Stain a detekovány pod UV světlem.

Pro horizontální DNA elektroforézu byl podle tabulky č. 5 připraven roztok pro 1% agarózový gel s barvivem. Roztok agarózy byl nalit do připravené elektroforetické aparatury a ponechán ke ztuhnutí po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po ztuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické vany a zalit 0,5x TBE pufrem. Do jamek v agarózovém gelu byly naneseny vzorky (1-10 µl), které byly předtím smíchány s nanášecí barvou (1 µl 5x LB + 5 µl vzorku). Pro určení délky fragmentů DNA byl do jedné jamky nanesen marker molekulových hmotností GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. Elektroforetická separace probíhala za stálého napětí 8V/cm, dokud nanesené barvivo ve vzorcích nedoputovalo zhruba 1 cm od spodního okraje agarózového gelu. Separované fragmenty DNA byly zobrazeny a analyzovány pod UV světlem.

Složení agarózového gelu	
složka	Množství / objem
Agaróza	0,3 g
0,5x TBE	30 ml
barvivo	3 $\mu$ l
celkový objem	30 ml

**Tabulka 5: Složení 1% agarózového gelu.**

#### 4.19.8 Restrikční štěpení DNA

Reakce pro štěpení DNA obsahovala plazmidovou DNA, restrikční enzym (0,2-1 U/ $\mu$ g DNA) a restrikční pufr. Restrikce DNA byla prováděna v objemu 20-100  $\mu$ l. Štěpící směs byla inkubována při 37 °C 3-16 h. V případě štěpení enzymem EcoRI byl enzym v restrikční směsi deaktivován 10 minut při 65 °C. Efektivita restrikčního štěpení byla detekována na DNA elektroforéze v 1% agarózovém gelu.

#### 4.19.9 Srážení DNA

Štěpená DNA byla vysrážena pomocí 2,5násobku objemu 96% ethanolu a 0,1 násobku objemu 3M ostanu sodného (pH=5,2) a inkubována při -20 °C 16-20h. Směs byla 30 minut centrifugována při 20 000 g a 4 °C. Pelet byl rozpuštěn v 1 ml 70% etanolu. Směs byla opět 30 minut centrifugována při 20 000 g a 4 °C a supernatant byl odstraněn. Mikrozkuhavka byla ponechána 10 minut při laboratorní teplotě, dokud se etanol neodpařil. Poté bylo do mikrozkuhavky přidáno 10-50  $\mu$ l TE pufru, pelet byl resuspendován a DNA byla uchována při -20°C.

#### 4.19.10 Re-cirkulalizace plazmidu T4 DNA ligázou

DNA byla cirkularizována použitím T4 DNA ligázy (Thermo Fisher Scientific) dle protokolu od výrobce. Linearizovaná plazmidová DNA (150 ng) byla smíchána s 20  $\mu$ l ligačního pufru (10 x koncentrovaný) a 10 U T4 DNA ligázy. Objem směsi byl doplněn H<sub>2</sub>O do celkového objemu 200  $\mu$ l. Ligační směs byla inkubována 16 h při 20°C. Po ukončení inkubace byla ligáza tepelně inaktivována (10 minut při 65 °C) a koncentrovaná srážením. Cirkularizovaná DNA byla použita jako templát pro PCR.

#### 4.19.11 Polymerázová řetězová (PCR)

Pro amplifikaci fragmentů DNA by použita Q5 polymeráza (New England Biolabs). Reakční směs byla připravena dle tabulky č. 6 a reakce probíhala za podmínek uvedených v tabulce č. 7. Produkt PCR reakce byl přečištěn za použití soupravy High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) dle instrukcí výrobce. Efektivita replikace a velikost PCR produktu byla zkontrolována metodou DNA elektroforézy v agarózovém gelu.

Složení reakční směsi pro PCR	
reakční složky	Objem 1 reakce
F primer (10 $\mu$ M)	0,6 $\mu$ l
R primer (10 $\mu$ M)	0,6 $\mu$ l
Templátová DNA (1 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	0,4 $\mu$ l
Q5 polymeráza (2 u/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
reakční pufr	4 $\mu$ l
PCR H <sub>2</sub> O	13,2 $\mu$ l
celkový objem	20 $\mu$ l

Tabulka 6: Složení PCR reakční směsi.

Reakční cykly pro PCR reakci			
název kroku		teplota	čas
iniciační denaturace		98 °C	30 s
30 cyklů	denaturace	98 °C	10 s
	nasedání primerů	54 °C	30 s
	elongace	72 °C	90 s
konečné prodloužení PCR produktů		72 °C	2 min

Tabulka 7: Reakční podmínky PCR reakce.

#### 4.19.12 Plazmid pEF1-MPyV-early

Plazmid pEF1-MPyV-early byl připraven LR rekombinací donorového vektoru obsahujícího sekvenci časně oblasti genomu MPyV a cílového plazmidu pEF-DEST 51 (Thermo Fisher Scientific). Donorový vektor pENTR-MPyV-early byl připraven přímým TOPO klonováním fragmentu DNA (časná oblast MPyV genomu) do plazmidu pENTR-D-TOPO (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.19.13 Plazmid pEF1-BKPyV-early

Plazmid pEF1-BKPyV-early byl připraven LR rekombinací donorového vektoru obsahujícího sekvenci časně oblasti genomu BKPyV a cílového plazmidu pEF-DEST 51 (Thermo Fisher Scientific).

Scientific). Donorový vektor pENTR-BKPyV-early byl připraven přímým TOPO klonováním fragmentu DNA (časná oblast BKPyV genomu) do plazmidu pENTR-D-TOPO (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.19.14 TOPO klonování (příprava donorového vektoru)

Amplifikovaný a přečištěný fragment DNA byl pomocí komerční soupravy pro TOPO® klonování – pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit, with One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli (Thermo Fisher Scientific) vložen do plazmidu pENTR/D-TOPO.

Fragment DNA byl smíchán s v molárním poměru 1:1 s TOPO vektorem, směs byla jemně promíchána a inkubována 5 minut při 37°C. Reakční směsí (2 µl) byly transformovány bakterie tepelným šokem.

#### 4.19.15 Transformace bakterií tepelným šokem

Na ledu byly rozmrazeny kompetentní bakterie a bylo k nim přidáno 2 µl reakční směsi po TOPO klonování. Směs byla inkubována na ledu po dobu 30 minut. Po uplynutí inkubační doby byla směs na 30 sekund vložena do vodní lázně o teplotě 42 °C a ihned přenesena zpět na led a inkubována 2 min. Do mikrozkuhavky bylo neprodleně přidáno 250 µl SOC média. Směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C v orbitálním inkubátoru (150 rpm). Po inkubaci byla bakteriální kultura vyseta v různých množstvích na misky s pevným médiem obohaceným o selekční antibiotikum. Misky byly přeneseny do termostatu s teplotou 37 °C a byly inkubovány 16-20h dnem vzhůru.

#### 4.19.16 Minipreparace rekombinantních plazmidů alkalickou metodou

Do mikrozkuhavek se 700 µl nutričního LB média se selekčním antibiotikem byly zaočkovány bakteriální monokolonie, jež narostly na agarových plotnách se selekčním antibiotikem po transformaci. Bakterie byly inkubovány v mikrozkuhavkách v orbitálním inkubátoru 16-20 h při 37 °C a 200 rpm. Bakterie byly peletovány (1 min; 12 000 g) a buněčný pelet byl resuspendován v 250 µl roztoku I. Bylo přidáno 250 µl roztoku II, směs byla jemně promíchána a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Po dokončení inkubace bylo přidáno 200 µl vychlazeného roztoku III, obsah mikrozkuhavky byl promíchán otočením a inkubován 5 minut na ledu. Po dokončení inkubace byla směs centrifugována 10 minut při 20 000 g a 4 °C. Supernatant byl pipetou přemístěn do čisté mikrozkuhavky s 500 µl izopropanolu, směs byla

promíchána otočením zkumavky a inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Po dokončení inkubace byla směs 25 minut centrifugována při 4 °C a 20 000 g. Supernatant byl odstraněn, pelet promyt 500 µl 70% ethanolu a znovu centrifugován 25 minut při 4 °C a 20 000g. Supernatant byl odstraněn a pelet ponechán v otevřené mikrozukmavce při laboratorní teplotě, dokud nezmizel zápach ethanolu (zhruba 10 minut) a rozpuštěn v 10 µl H<sub>2</sub>O. Izolovaná DNA byla štěpena restričními endonukleázami

#### 4.19.17 Rekombinace plazmidů systémem Gateway – LR rekombinace

Pro rekombinaci plazmidů byla využita komerční souprava Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix (ThermoFisher Scientific). Rekombinační reakce probíhaly mezi donorovým vektorem obsahující časnou kódující oblast polyomavirů (pENTR-MPyV-early či pENTR-BKPyV-early) a cílovým plazmidem pEF-DEST51 určeným pro expresi v savčích buňkách.

Do mikrozukmavky bylo nanášeno 150 ng donorové DNA (pENTR-MPyV-early či pENTR-BKPyV-early), 150 ng komerčního vektoru pEF-DEST51 a objem mikrozukmavky byl doplněn do 8 µl TE pufrém. Směs byla pomíchána protažením špičkou pipety a doplněna 2 µl LR clonase II mixem. Směs byla inkubována při 25 °C 20h. Druhý den byl k rekombinační směsi přidán 1 µl proteinázy K a mikrozukmavka byla 10 minut inkubována v bločku nastaveném na 37 °C. Vzniklý plazmid byl do bakterií vnesen elektroporací.

#### 4.19.18 Transformace bakterií elektroporací

Kompetentní bakterie *E.coli* (připravené v laboratoři) byly rozmrazeny na ledu a 45 µl bakterií bylo přesunuto do mikrozukmavky. K bakteriím byl přidán 1 µl LR rekombinační směsi a obsah zkumavky byl promíchán pipetou. Reakční směs byla přesunuta do vychlazené elektroporační kyvety (vzdálenost elektrod 2 mm). Kyveta byla řádně osušena a vložena do elektroporátoru, a byl aplikován elektrický pulz (2,5V, 25µF, 200 Ω) po dobu 4-5. Po aplikování proudu byl do kyvety neprodleně přidán 1 ml SOC média a bakteriální suspenze byla přenesena do Erlenmeyerovy baňky. Bakterie byly kultivovány 1 hodinu v orbitálním inkubátoru při 37 °C a 150 rpm. Poté byly bakterie rozetřeny na misky s pevným médiem obsahujícím ampicilin v objemu 10 µl, 100 µl a 950 µl. Vyšetě misky byly inkubovány v termostatu při 37 °C dnem vzhůru po dobu 16 - 20 hodin.

## 5 Výsledky:

### 5.1 Studium vlivu HDAC6 na replikační cyklus polyomavirů

V první části diplomového projektu jsme se zaměřili na studium vlivu buněčného proteinu HDAC6 na replikační cyklus myšího polyomaviru a lidského BK viru. Pro studium efektu HDAC6 na replikaci viru byly zvoleny dva rozličné přístupy: i) replikace viru byla sledována v buňkách s deletovaným genem pro HDAC6 ii) replikace viru byla sledována v buňkách s inhibovanou HDAC6 specifickým inhibitorem, tubacinem (Haggarty et al., 2003). U buněk s deletovanou nebo inhibovanou HDAC6 jsme sledovali efektivitu infekce, expresi virových proteinů a produkci virového potomstva.

#### 5.1.1 Stanovení efektivní inhibiční koncentrace tubacinu

Jedním ze způsobů, jak jsme se rozhodli studovat vliv aktivity HDAC6 na průběh infekce polyomaviry, byla inhibice HDAC6 specifickým inhibitorem tubacinem.

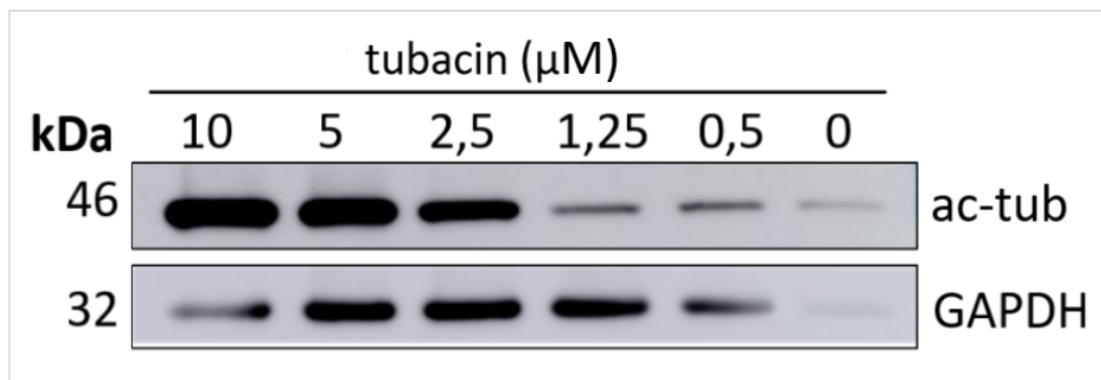
Nejprve byla stanovena citlivost buněk myších fibroblastů 3T6 a lidských buněk RPTEC/hTERT1 k tubacinu. Efektivita inhibice HDAC6 může být detekována pomocí sledování nárustu hladiny acetylovaného  $\alpha$ -tubulinu, jenž je jedním z nejlépe charakterizovaných substrátů HDAC6. K buňkám bylo přidáno médium obsahující vzrůstající koncentraci tubacinu (0,5 - 10  $\mu$ M). Jako negativní kontrola (NK) sloužily buňky inkubované pouze s médiem (bez tubacinu). Buňky byly inkubovány s tubacinem 24 h nebo 48 h, lyzovány a proteiny obsažené v lyzátech byly rozděleny na SDS PAGE. Proteiny byly poté přeneseny z gelu na nitrocelulózovou membránu, acetylovaný tubulin a GAPDH byly značeny specifickými protilátkami a jejich množství v jednotlivých lyzátech bylo stanoveno analýzou western blotů. Množství acetylovaného tubulinu bylo porovnáno s množstvím tohoto proteinu v lyzátu kontrolních buněk (ošetřených pouze DMSO).

Očekávali jsme, že v obou typech buněk bude se zvyšující se koncentrací inhibitoru stoupat hladina acetylovaného tubulinu. Inkubace myších fibroblastů 3T6 se zvyšující se koncentrací tubacinu vedla podle očekávání ke zvýšení hladiny acetylovaného tubulinu oproti kontrolním buňkám po inkubaci 24h i 48h (obrázek 8-9). Signifikantní zvýšení hladiny acetylovaného tubulinu bylo detekováno v koncentracích 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M v obou inkubačních časech. Avšak při nejvyšší koncentraci inhibitoru byla pozorována zvýšená toxicita, která se projevovala odumíráním buněk. Pro další experimenty byly tedy vybrány koncentrace

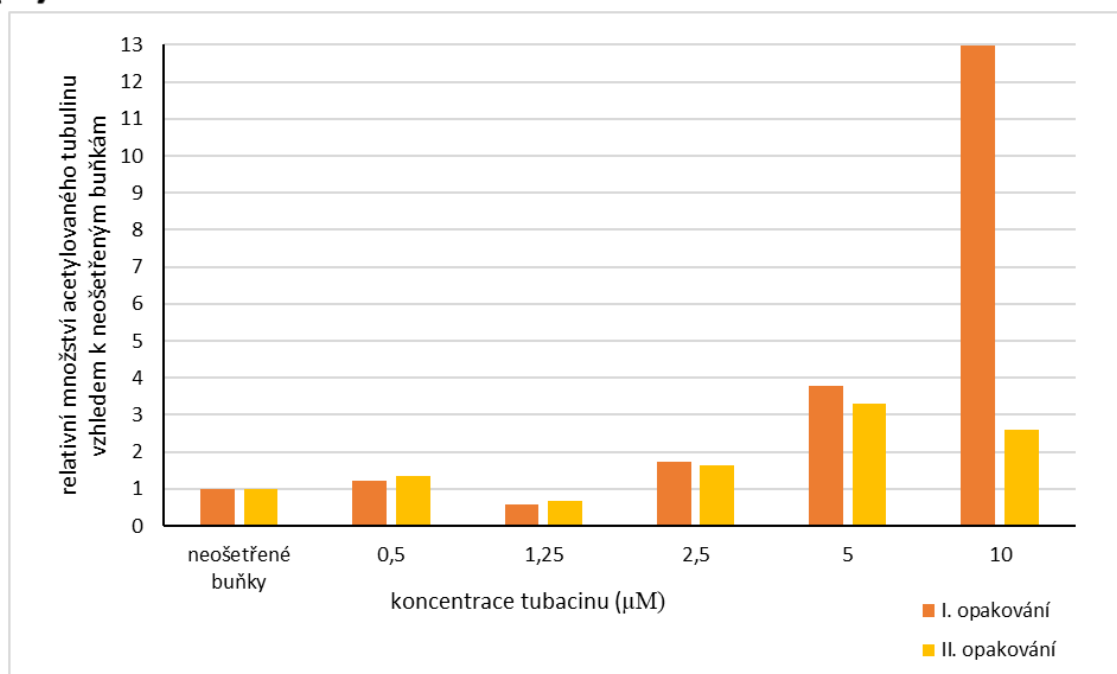


tubacinu 2,5  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$  a doba působení inhibitoru 24h. Tyto koncentrace inhibitoru signifikantně zvyšovaly hladinu acetylovaného tubulinu, tedy inhibují deacetylační činnost HDAC6, a zároveň ještě nebyly pro buňky toxické.

**(A)**

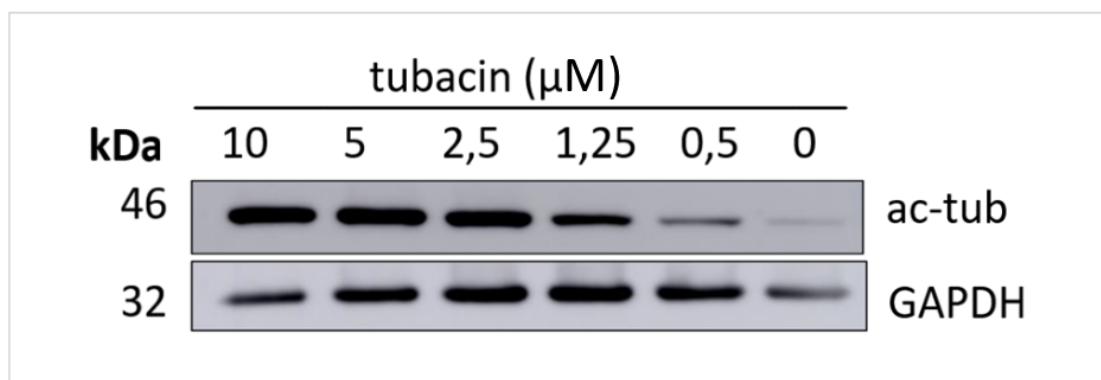


**(B)**

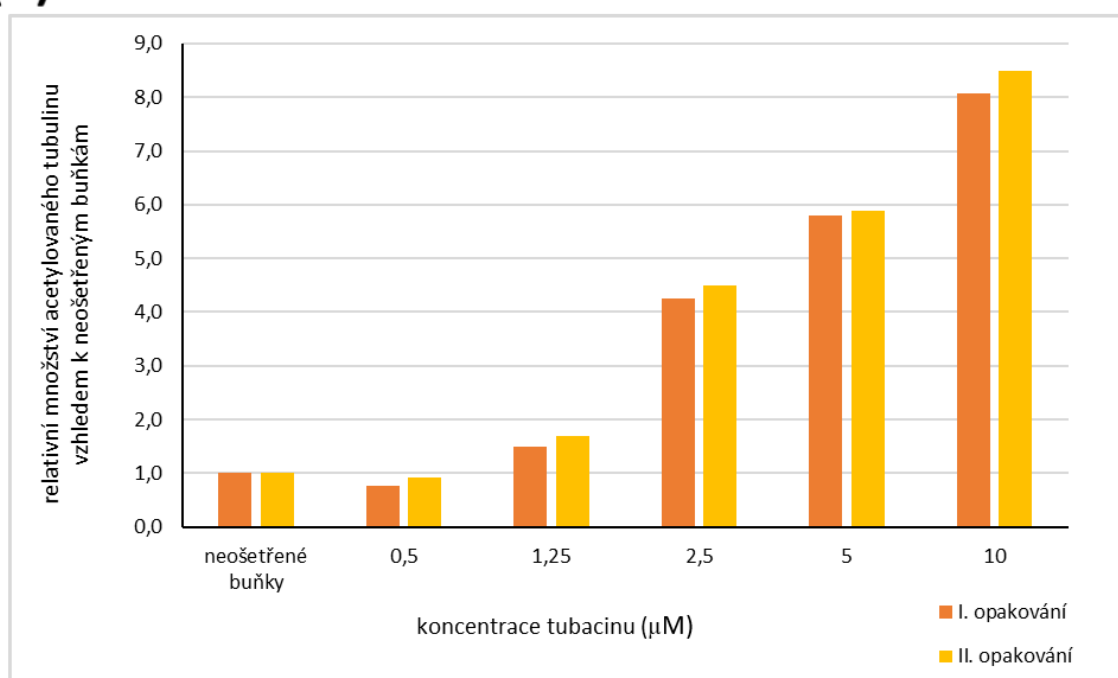


**Obrázek 8: Množství acetylovaného tubulinu v buňkách 3T6 roste se zvyšující se koncentrací tubacinu – inkubace 24 hodin. (A)** Buňky 3T6 byly inkubovány 24h s tubacinem v různých koncentracích. Buňky byly lyzovány, lyzáty byly separovány na SDS-PAGE, přeneseny na membránu a acetylovaný tubulin a GAPDH byly označeny specifickými protilátkami. **(B)** Grafické znázornění denzitometrické analýzy digitálních snímků western blotů ze dvou nezávislých experimentů. Ukázáno je relativní množství acetylovaného tubulinu vztahového na množství tohoto proteinu v neošetřených buňkách.

**(A)**



**(B)**

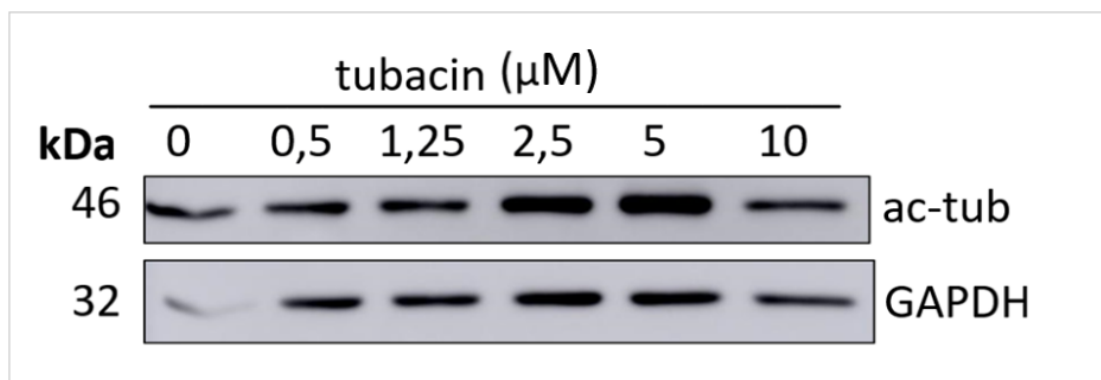


**Obrázek 9: Množství acetylovaného tubulinu v buňkách 3T6 roste se zvyšující se koncentrací tubacinu – inkubace 48 hodin. (A)** Buňky 3T6 byly inkubovány 48h s tubacinem v různých koncentracích. Buňky byly lyzovány, lyzáty byly separovány na SDS-PAGE, přeneseny na membránu a acetylovaný tubulin a GAPDH byly označeny specifickými protilátkami. **(B)** Grafické znázornění denzitometrické analýzy digitálních snímků western blotů ze dvou nezávislých experimentů. Ukázáno je relativní množství acetylovaného tubulinu vztažené na množství tohoto proteinu v neošetřených buňkách.

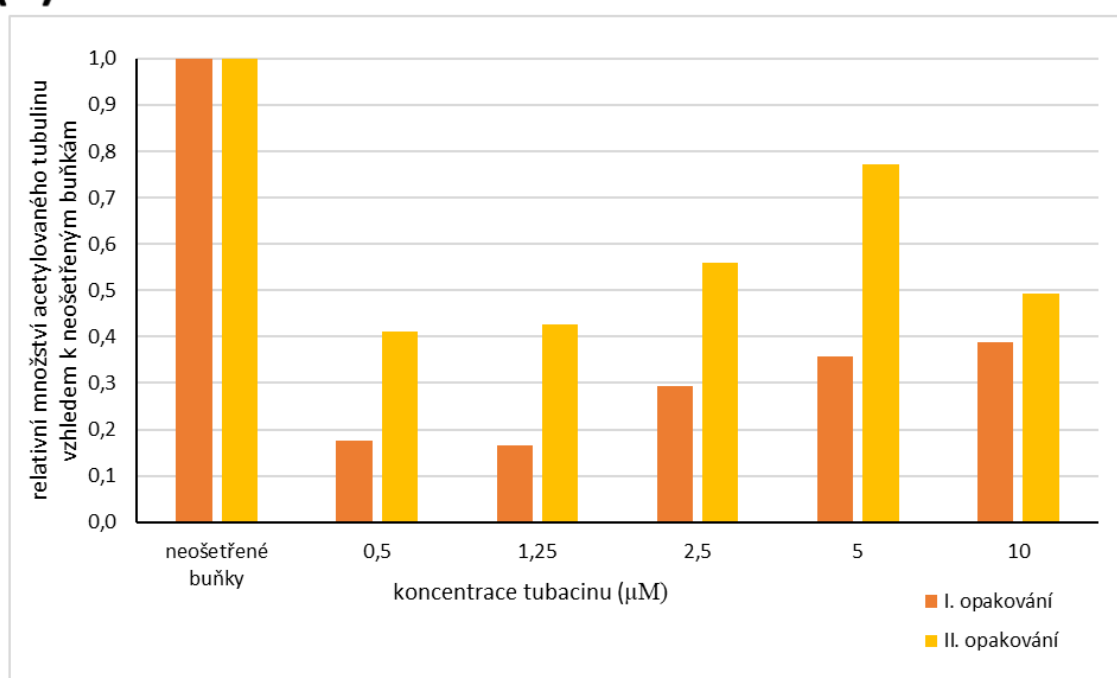
Na rozdíl od myších fibroblastů, u linie RPTEC/hTERT1 bylo při kontrole stavu buněk pod mikroskopem zjištěno, že tubacin vytváří s ProxUp médiem agregáty, jenž zřejmě zabraňují působení inhibitoru na HDAC6 v buňkách. Tato domněnka byla následně potvrzena i analýzou množství acetylovaného tubulinu v lyzátech buněk ošetřených tubacinem. Při inkubaci s tubacinem v buňkách nedocházelo k inhibici deacetylační činnosti HDAC6, naopak měla

hladina acetylovaného tubulinu v buňkách se zvyšující koncentrací tubacinu tendenci se snižovat. V čase 24 hodin i 48 hodin byly detekovány nelogicky se snižující hladiny acetylovaného tubulinu oproti kontrolním buňkám (obrázek 10 a 11). Zároveň byl pozorován toxický vliv tubacinu v médiu, zabraňující lidským ledvinným buňkám ve standardním růstu či přímo vedoucí k jejich masovému odumírání. Proto byl vliv inhibice HDAC6 na průběh polyomavírové infekce studován pouze na modelovém myším polyomaviru a myších fibroblastech, kde byl tubacin plně funkční.

(A)

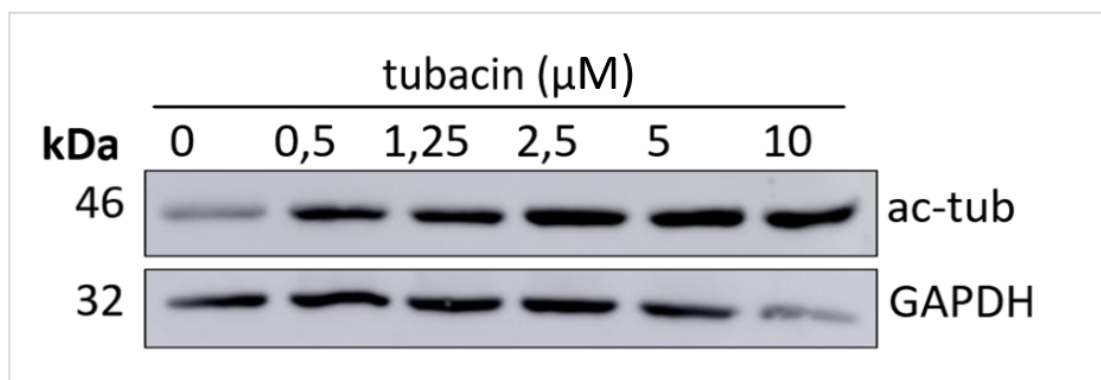


(B)

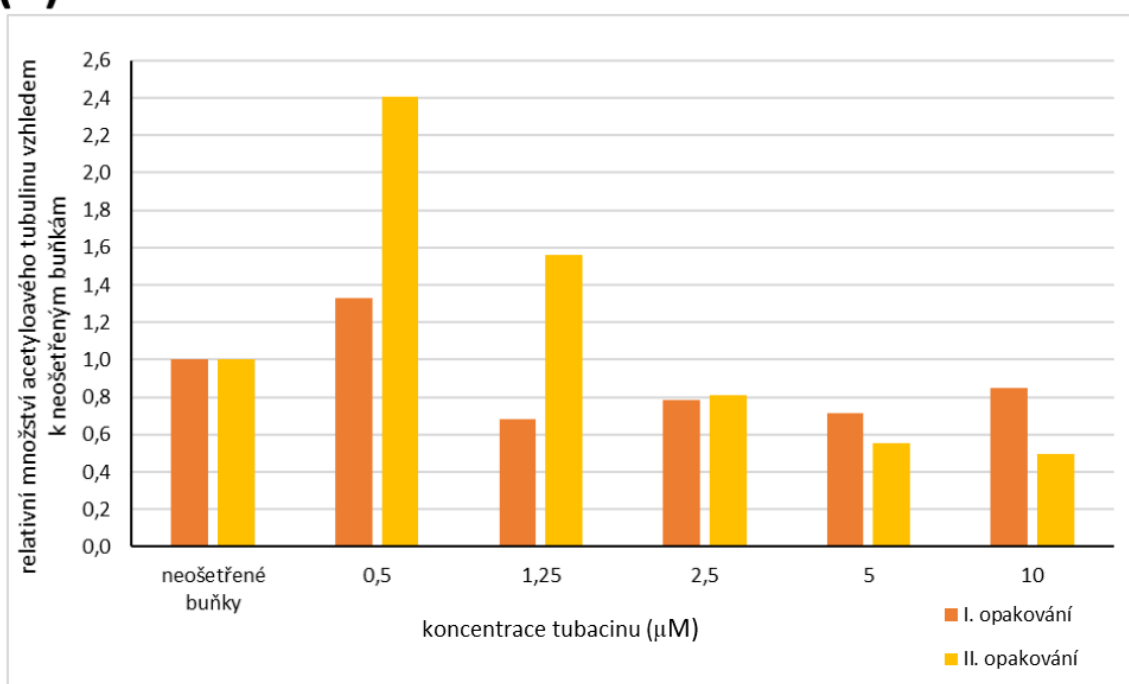


**Obrázek 10: Množství acetylovaného tubulinu v buňkách RPTEC/hTERT1 se nemění se zvyšující se koncentrací tubacinu – inkubace 24 hodin.** (A) Buňky RPTEC/hTERT1 byly inkubovány 24h s tubacinem v různých koncentracích. Buňky byly lyzovány, lyzáty byly separovány na SDS-PAGE, přeneseny na membránu a acetylovaný tubulin a GAPDH byly označeny specifickými protilátkami. (B) Grafické znázornění denzitometrické analýzy digitálních snímků western blotů ze dvou nezávislých experimentů. Ukázáno je relativní množství acetylovaného tubulinu vztahované na množství tohoto proteinu v neošetřených buňkách.

(A)



(B)



**Obrázek 11: Množství acetylovaného tubulinu v buňkách RPTEC/hTERT1 se nemění se zvyšující se koncentrací tubacinu – inkubace 48 hodin.** (A) Buňky RPTEC/hTERT1 byly inkubovány 48h s tubacinem v různých koncentracích. Buňky byly lyzovány, lyzáty byly separovány na SDS-PAGE, přeneseny na membránu a acetylovaný tubulin a GAPDH byly označeny specifickými protilátkami. (B) Grafické znázornění denzitometrické analýzy digitálních snímků western blotů ze dvou nezávislých experimentů. Ukázáno je relativní množství acetylovaného tubulinu vztahujícího se na množství tohoto proteinu v neošetřených buňkách.

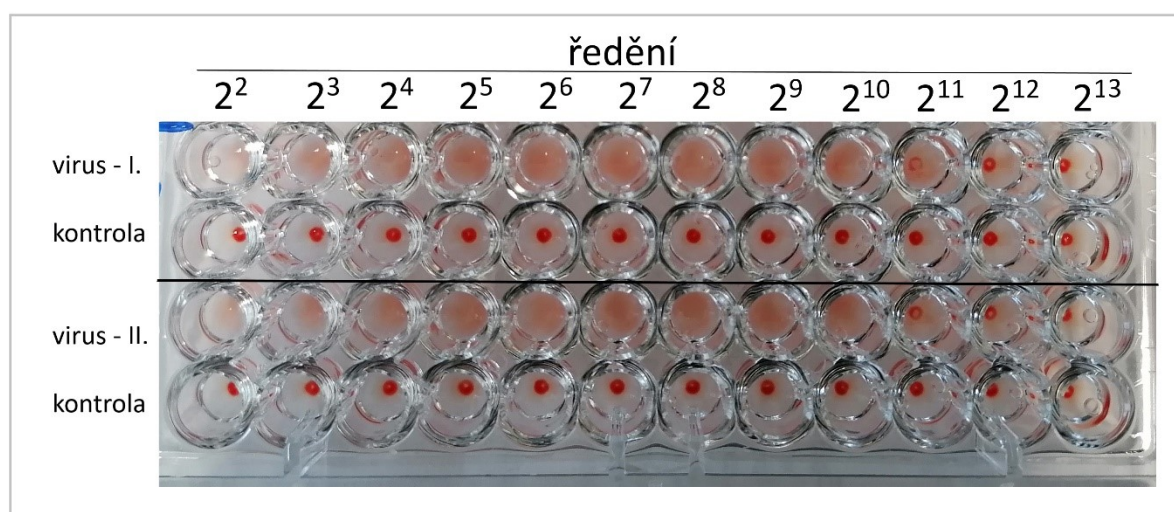
### 5.1.2 Izolace viru MPyV

Pro studium efektivity infekce bylo nejprve nutné získat dostatečné množství infekčních partikulí viru MPyV. Virus byl proto izolován z infikovaných buněk 3T6 nasazených na 10 Petriho miskách (Ø 10 cm). Buňky byly zmrazeny 5 dní po infekci, kdy už se projevoval cytopatický efekt u naprosté většiny z nich. Virus byl z buněk izolován ultracentrifugací přes sacharózový polštář a přečištěn přes gradient CsCl (Horníková et al., 2015).

Počet nově získaných virových částic v izolátu byl stanoven hemaglutinačním testem (obrázek 12) a infekční titr byl stanoven dle kapitoly 4.16.3.

Hemaglutinační titr:  $T = 2,04 \times 10^5$  HAU/ml, což odpovídá  $2 \times 10^{12}$  částic/ml.

Infekční virový titr  $T = 10^8$  ffu/ml.

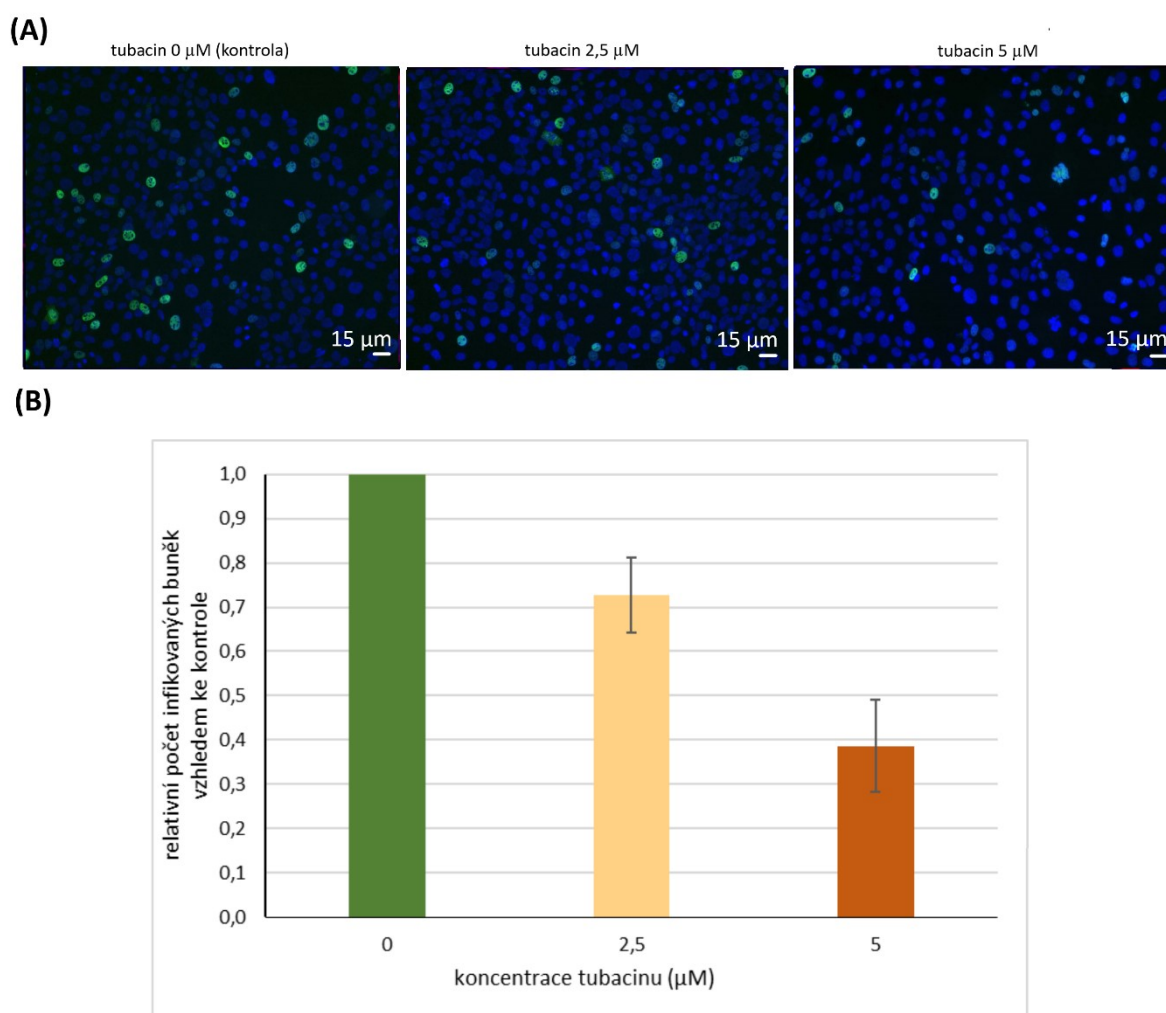


**Obrázek 12: Hemaglutinační test MPyV.** Virové inokulum bylo 10x naředěno, smícháno v 96 jamkové destičce s hemaglutinačním pufrům a ředěno dvojkovou ředící řadou. Po 1 hodině inkubace byl odečten stav aglutinace v ředící řadě. Test byl proveden v duplikátech s kontrolou pro obě ředící řady.

### 5.1.3 Inhibice HDAC6 tubacinem snižuje efektivitu infekce buněk MPyV

Jako první nás zajímalo, jestli má inhibice HDAC6 vliv na efektivitu infekce buněk myším polyomavirem. Buňky linie 3T6 byly infikovány MPyV a současně s přidáním viru bylo přidáno i médium s inhibitorem (výsledná koncentrace 5 a 2,5  $\mu$ M). Buňky byly inkubovány s inhibitorem 24h, následně fixovány a specifickými protilátkami byl označen LT antigen. Počet infikovaných (LT pozitivních) buněk v každém vzorku byl určen pomocí fluorescenčního mikroskopu. Tubacin vykazoval inhibiční aktivitu, která byla závislá na jeho koncentraci. V

buňkách ošetřených 2,5  $\mu\text{M}$  tubacinem jsme detekovali o 27 % méně LT pozitivních buněk oproti kontrole a u buněk inkubovaných s 5  $\mu\text{M}$  tubacinem bylo detekováno o 61 % méně infikovaných (LT pozitivních) buněk než u buněk kontrolních (obrázek 13). Jelikož se v závislosti na koncentraci tubacinu prokázalo významné omezení v počtu infikovaných buněk, můžeme předpokládat, že HDAC6 skutečně ovlivňuje průběh polyomavirové infekce.



**Obrázek 13: Inkubace buněk s inhibitorem HDAC6 ovlivňuje efektivitu infekce.** Buňky linie 3T6 byly infikovány MPyV a zároveň s infekcí byly buňky ošetřeny tubacinem v koncentracích 0  $\mu\text{M}$  (kontrola), 2,5  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ . Buňky byly s inhibitorem inkubovány 24h. Buňky byly fixovány 24 hpi a specifickými protilátkami byl detekován LT antigen. Pozitivní buňky byly spočítány pomocí fluorescenční mikroskopie. **(A)** Fotografie z fluorescenčního mikroskopu ilustrující změny počtu LT pozitivních buněk (zelená barva), buněčná jádra jsou značena DAPI (modře). **(B)** Hodnoty v grafu představují relativní množství infikovaných buněk vzhledem ke kontrole a reprezentují průměrnou hodnotu z 30 optických polí (cca 1400 buněk) ze tří nezávislých experimentů. +/- sd.

V souvislosti s prvotními výsledky jsme se rozhodli pokračovat ve studiu vlivu inhibice HDAC6 na další fáze infekce. Infektivita polyomavirů je zcela závislá na funkčních mikrotubulech

(Horníková et al., 2020a). Acetylce, respektive deacetylce tubulinu, hlavní stavební složky mikrotubulů, je zásadní pro udržování schopnosti měnit jejich organizaci v buňce. Inhibice HDAC6 má vliv, mimo jiné, na acetylaci mikrotubulů, čímž ovlivňuje jejich dynamiku a nepřímo tak může omezovat infektivitu polyomavirů (Hubbert et al., 2002; Skultetyova et al., 2017). Proto jsme se rozhodli ověřit, zda snížená infektivita není zapříčiněna právě tímto narušením pohybu virionů k jádru, způsobeným změnou stability mikrotubulů v důsledku inhibice HDAC6. Tubacin byl tedy přidán k infikovaným buňkám v různých časech po infekci, abychom mohli odlišit jednotlivé fáze vstupu viru do buňky. Inhibitor byl přidán k infikovaným buňkám 3 hpi, kdy se většina viru nachází v endoplazmatickém retikulu a 6 hpi, kdy virus vstupuje do jádra buněk (Mannová a Forstová 2003; Soldatova et al., 2018).

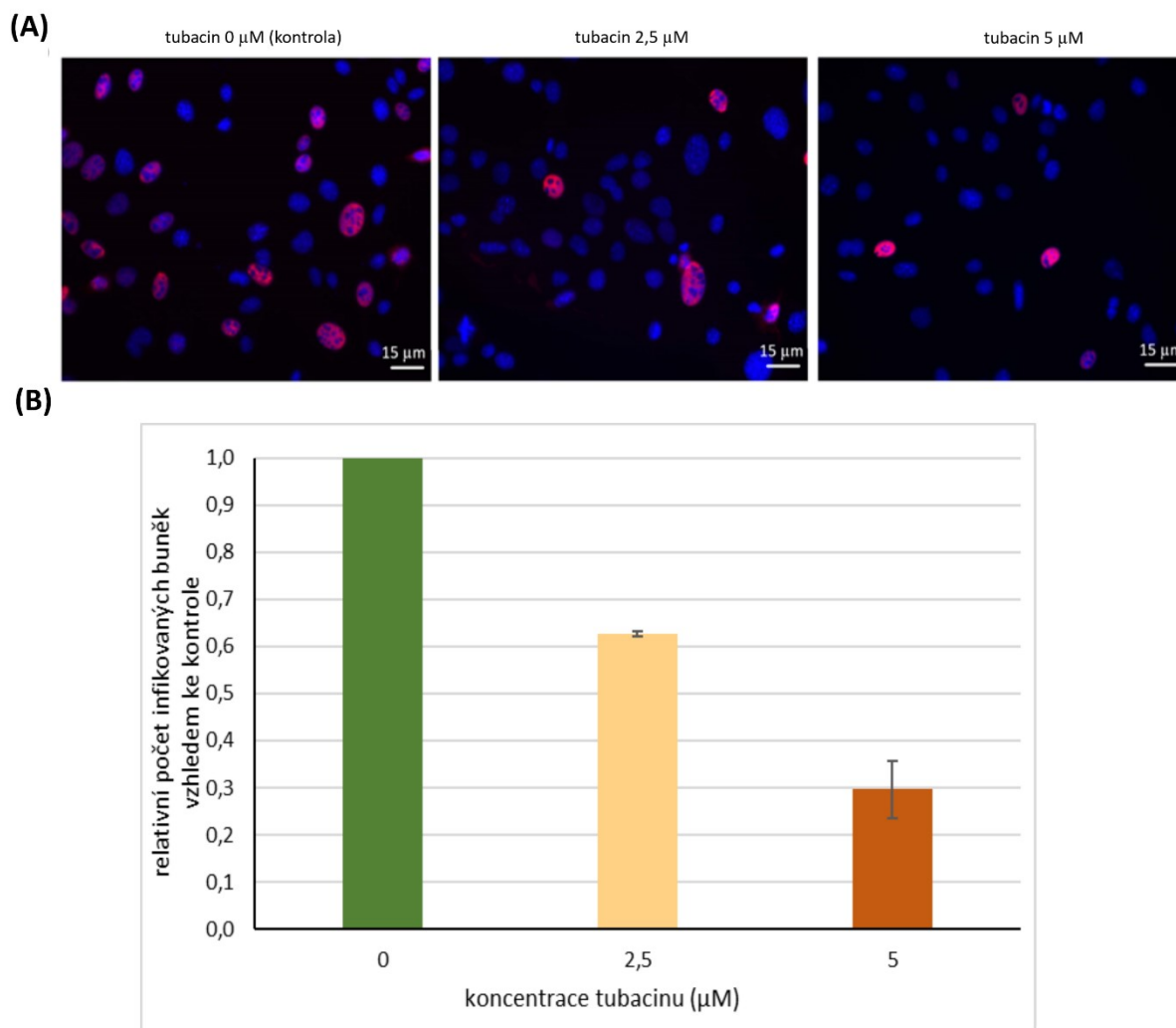
Buňky linie 3T6 byly infikovány MPyV a 3hpi nebo 6hpi byl přidán inhibitor (výsledná koncentrace 5  $\mu$ M a 2,5  $\mu$ M). Buňky byly inkubovány s inhibitorem (dokud nebyly fixovány), 24hpi byly fixovány a v buňkách byl označen LT antigen metodou nepřímé imunofluorescence. Počet infikovaných buněk v každém vzorku byl určen pomocí fluorescenčního mikroskopu.

V obou sledovaných časech vykazoval tubacin inhibiční aktivitu, která byla závislá na jeho koncentraci. V čase přidání tubacinu k buňkám 3 hpi (obrázek 14) jsme pozorovali stejný trend a stejný inhibiční potenciál jako u buněk, u kterých byl tubacin přidán společně s virem. V buňkách ošetřených 2,5  $\mu$ M tubacinu bylo zachyceno o 37 % méně infikovaných (LT pozitivních) buněk oproti kontrole. V buňkách inkubovaných s 5  $\mu$ M tubacinem bylo detekováno o 70 % méně infikovaných buněk než v neošetřených buňkách.

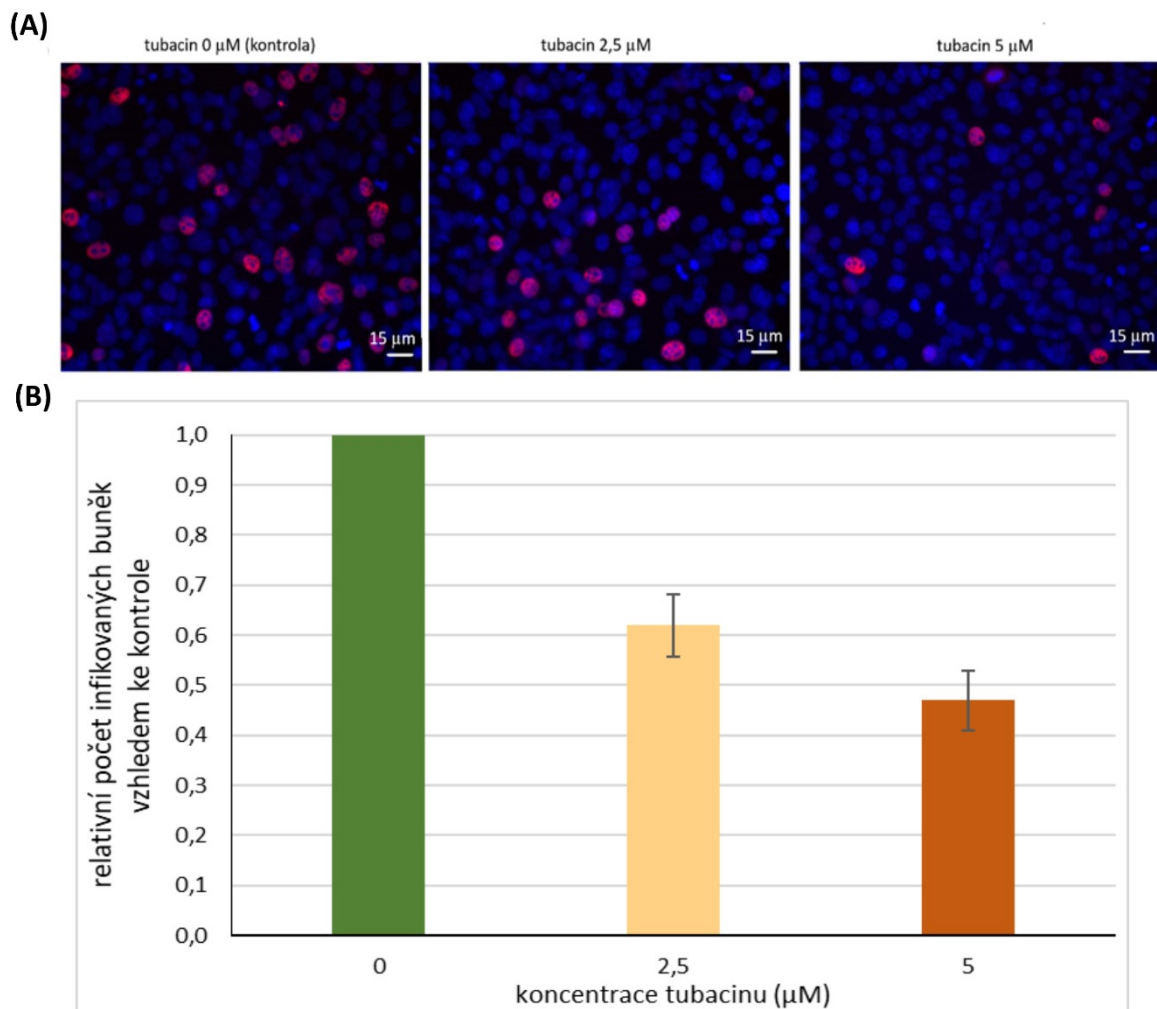
Pokud byl tubacin přidán 6 hpi, pozorovali jsme sice stejný trend inhibice, ale nižší inhibiční potenciál než u buněk, u kterých byl tubacin přidán společně s virem (obrázek 15). V buňkách ošetřených 2,5  $\mu$ M tubacinem bylo zachyceno o 38 % méně infikovaných (LT pozitivních) buněk a v buňkách inkubovaných s 5  $\mu$ M tubacinem bylo detekováno o 53 % méně infikovaných buněk oproti neošetřeným buňkám.

Přidáním tubacinu ve všech výše zmiňovaných časech jsme dosáhli snížení počtu infikovaných buněk. Tento trend se prokázal závislý na koncentraci tubacinu, potažmo míře inhibice HDAC6. Získaná data naznačují, že i když tubacin pravděpodobně neovlivňuje transport viru od cytoplazmatické membrány do endoplazmatického retikula, tak inhibice HDAC6 negativně ovlivňuje časnou fázi infekce MPyV, stejně tak jako další fáze infekce.





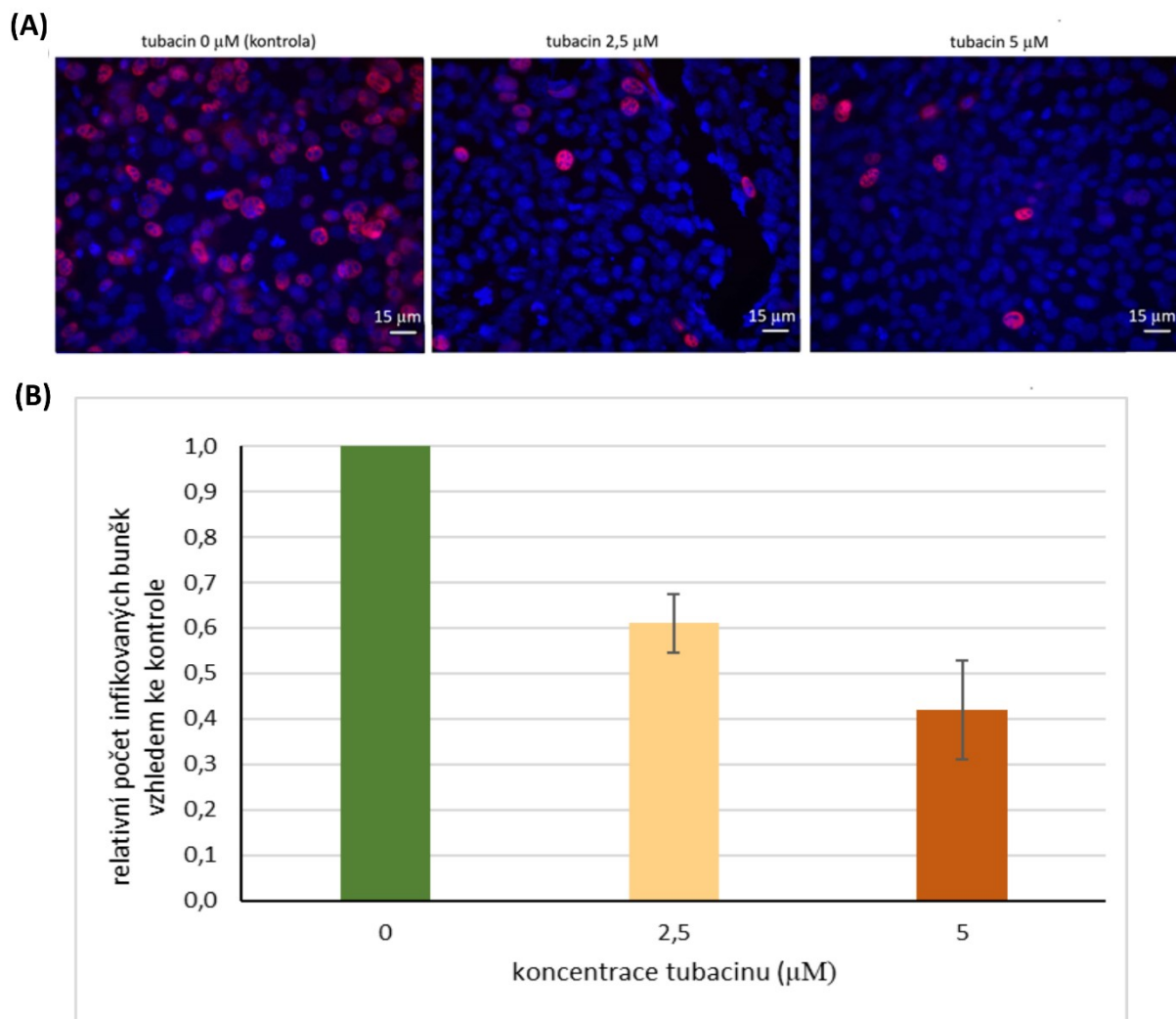
**Obrázek 14: Inhibice HDAC6 3hpi ovlivňuje efektivitu infekce.** Buňky linie 3T6 byly infikovány MPyV a 3 hodiny po infekci byly buňky ošetřeny tubacinem v koncentracích 0  $\mu\text{M}$  (kontrola), 2,5  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ . Buňky byly s inhibitorem inkubovány 21h. Buňky byly fixovány 24 hpi a specifickými protilátkami byl detekován LT antigen. **(A)** Fotografie z fluorescenčního mikroskopu ilustrující změny počtu LT pozitivních buněk (červená barva), buněčná jádra jsou značena DAPI (modře). **(B)** Pozitivní buňky byly spočítány pomocí fluorescenční mikroskopie. Hodnoty v grafu představují relativní množství infikovaných buněk vzhledem ke kontrole a reprezentují průměrnou hodnotu z 30 optických polí (cca 1400 buněk) ze tří nezávislých experimentů. +/- sd.



**Obrázek 15: Inhibice HDAC6 6hpi ovlivňuje efektivitu infekce.** Buňky linie 3T6 byly infikovány MPyV a 6 hodin po infekci byly buňky ošetřeny tubacinem v koncentracích 0  $\mu\text{M}$  (kontrola), 2,5  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ . Buňky byly s inhibitorem inkubovány 18h. Buňky byly fixovány 24 hpi a specifickými protilátkami byl detekován LT antigen. Pozitivní buňky byly spočítány pomocí fluorescenční mikroskopie. **(A)** Fotografie z fluorescenčního mikroskopu ilustrující změny počtu LT pozitivních buněk (červená barva), buněčná jádra jsou značena DAPI (modře). **(B)** Hodnoty v grafu představují relativní množství infikovaných buněk vzhledem ke kontrole a reprezentují průměrnou hodnotu z 30 optických polí (cca 1400 buněk) ze tří nezávislých experimentů. +/- sd.

#### 5.1.4 Inhibice HDAC6 v pozdní fázi infekce negativně ovlivňuje množství virových proteinů v infikovaných buňkách

Získaná data ukazují, že inhibice HDAC6 ovlivňuje množství buněk pozitivních na LT antigen. Toto snížení může být způsobeno nižší expresí a stabilitou LT antigenu nebo nižší replikací viru obecně. Předpokládali jsme, že se HDAC6 podílí spíše na regulaci metabolismu virových proteinů než na regulaci exprese virových genů, a proto byl tubacin přidán k infikovaným buňkám 24 hpi, kdy již dochází k masivní produkci časných antigenů a také k masivní replikaci virového genomu. Buňky byly inkubovány s inhibitorem 16 hodin, po uplynutí této doby byly fixovány a v buňkách byl označen LT antigen metodou nepřímé imunofluorescence. Počet infikovaných buněk v každém vzorku byl určen pomocí fluorescenčního mikroskopu. V čase přidání tubacinu 24 hodin po infekci u ošetřených buněk opět docházelo k poklesu počtu infikovaných (LT pozitivních) buněk (obrázek 16). Trend omezení schopnosti viru infikovat ošetřené buňky byl při přidání tubacinu v čase 24 hpi obdobný jako u času 6 hpi. U buněk ošetřených 2,5mM tubacinem bylo v průměru infikováno o 39 % buněk méně než u neošetřených buněk. U 5mM koncentrace byl pokles počtu infikovaných buněk 58%. Z analýzy těchto dat lze usuzovat, že inhibice HDAC 6 má negativní vliv na průběh virové infekce jak v časných fázích, tak i v pozdějších fázích infekce.



**Obrázek 16: Inhibice HDAC6 24hpi ovlivňuje množství LT pozitivních buněk v pozdní fázi infekce.** Buňky linie 3T6 byly infikovány MPyV a 24 hodin po infekci byly buňky ošetřeny tubacinem v koncentracích 0  $\mu\text{M}$  (kontrola), 2,5  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ . Buňky byly s inhibitorem inkubovány 16h. Buňky byly fixovány 40 hpi a specifickými protilátkami byl detekován LT antigen. Pozitivní buňky byly spočítány pomocí fluorescenční mikroskopie. **(A)** Fotografie z fluorescenčního mikroskopu ilustrující změny počtu LT pozitivních buněk (červená barva), buněčná jádra jsou značena DAPI (modře). **(B)** Hodnoty v grafu představují relativní množství infikovaných buněk vzhledem ke kontrole a reprezentují průměrnou hodnotu z 30 optických polí (cca 1400 buněk) ze tří nezávislých experimentů. +/- sd.

Snížení efektivity infekce v buňkách i během inhibice tubacinem v pozdní fázi infekce naznačuje, že by HDAC6 mohla ovlivňovat stabilitu virových proteinů.

### 5.1.5 Nepřítomnost HDAC6 má negativní vliv na replikaci viru

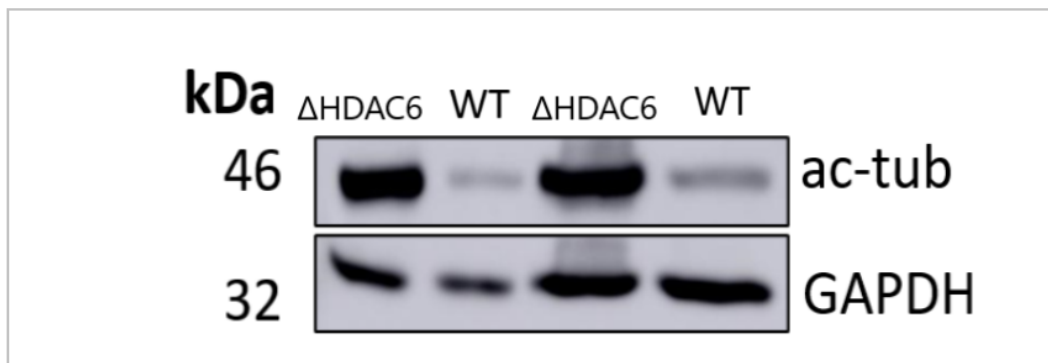
Data získaná z pokusů s inhibovanou HDAC6 ukazují, že enzymatická aktivita tohoto proteinu je důležitá pro replikaci MPyV. Proto nás dále zajímalo, jestli bude mít podobný efekt i nepřítomnost tohoto proteinu v buňce. K těmto pokusům jsme využili buňky 3T3 s geneticky vyřazenou HDAC6, u nichž jsme předpokládali obdobný efekt na průběh replikačního cyklu viru jako u buněk s inhibovanou HDAC6 pomocí tubacinu. Jako kontrolu jsme používali buňky 3T3-WT. Oba typy buněk byly získány od profesora Matthiase z Miescherova institutu pro biomedicínský výzkum (Boyault et al., 2007b).

Obdobně jako u buněk 3T6 ošetřených tubacinem, jsme nejprve ověřili množství acetylovaného tubulinu v buňkách 3T3-ΔHDAC6 (genetický KO HDAC6) a porovnali jej s množstvím tohoto proteinu v lyzátu kontrolních buněk (3T3-WT). Očekávali jsme, že v buňkách s chybějící HDAC6 bude vyšší hladina acetylovaného tubulinu oproti kontrole.

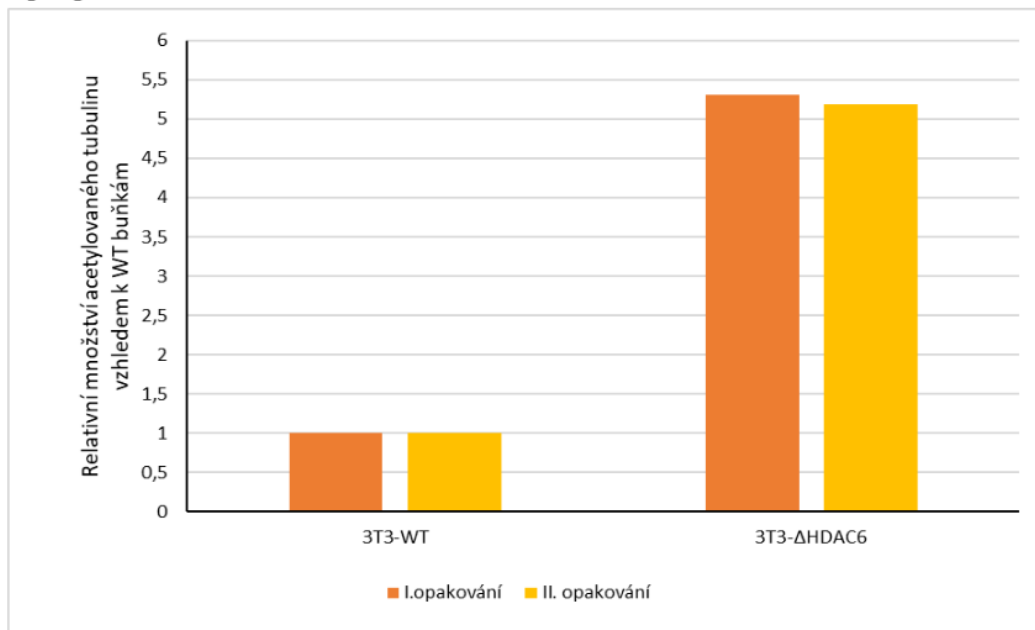
Z obou typů buněk byly připraveny lyzáty, proteiny byly rozděleny na SDS elektroforéze a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Acetylovaný tubulin a GAPDH byly značeny specifickými protilátkami a jejich množství v jednotlivých buněčných lyzátech bylo stanoveno analýzou western blotů. Podle očekávání, buňky 3T3-ΔHDAC6 vykazovaly vyšší míru acetylace, konkrétně se jednalo o zhruba 5násobně vyšší hladiny acetylovaného tubulinu oproti kontrole 3T3-WT (obrázek 17). Tyto výsledky jsou v souladu s předpokladem a předchozími prezentovanými daty, kdy byla funkce HDAC6 inhibována tubacinem.

V dalším experimentu jsme testovali, jestli má nepřítomnost HDAC6 vliv na efektivitu infekce MPyV. Buňky 3T3-ΔHDAC6 a 3T3-WT byly infikovány MPyV ( $\text{moi}=1$ ). Buňky byly s virovým inokulem inkubovány 24 hodin, po uplynutí této doby byly fixovány a v buňkách byl označen LT antigen metodou nepřímé imunofluorescence. Počet infikovaných buněk v každém vzorku byl určen pomocí fluorescenčního mikroskopu. U buněk bez HDAC6 docházelo obdobně jako u buněk ošetřených tubacinem k snížení počtu LT pozitivních buněk oproti kontrolním buňkám. Konkrétně se jednalo o pokles infektivy na 46% hodnoty v porovnání s kontrolními buňkami (obrázek 18).

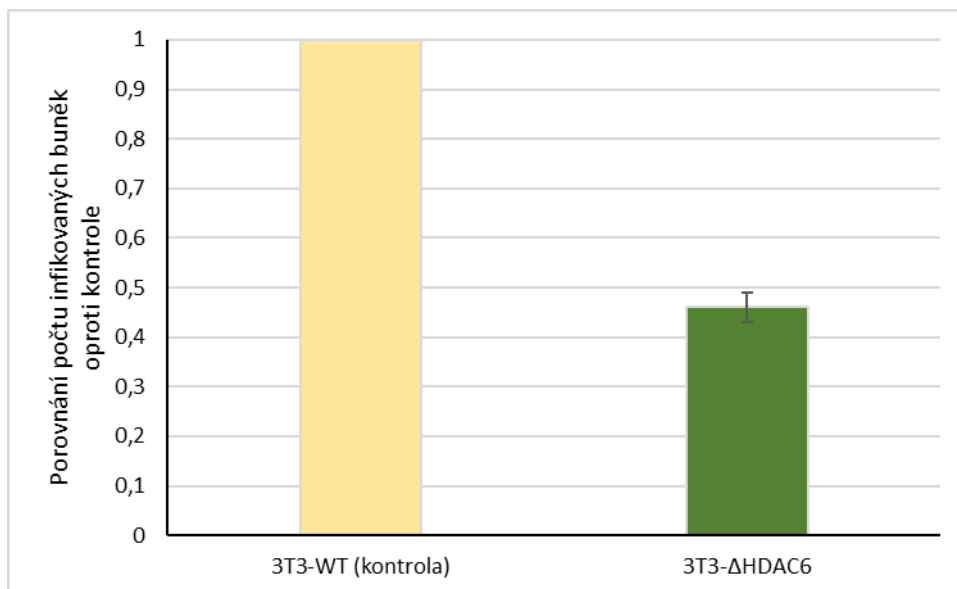
**(A)**



**(B)**



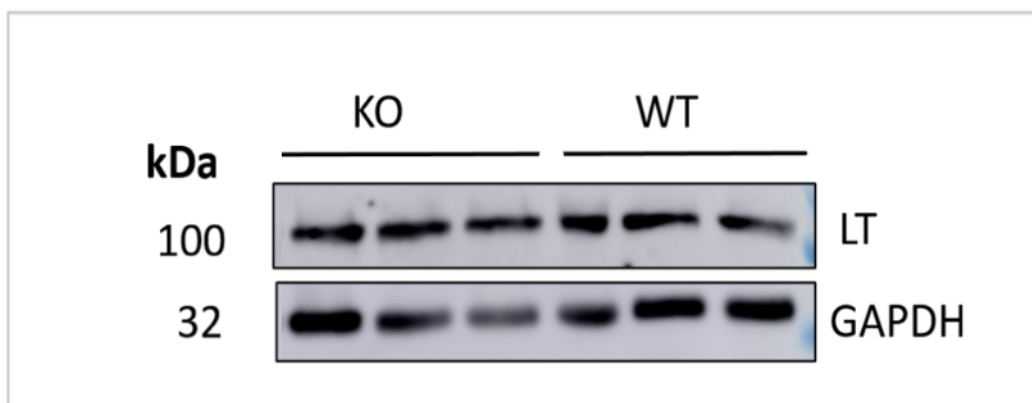
**Obrázek 17: Hladina acetylace tubulinu v 3T3-ΔHDAC6 buňkách. (A)** Buňky 3T3-WT a 3T3-ΔHDAC6 byly lyzovány, lyzáty byly separovány na SDS-PAGE a přeneseny na membránu. Acetylovaný tubulin a GAPDH byly označeny specifickými protilátkami. **(B)** Grafické znázornění denzitometrické analýzy digitálních snímků western blotů ze dvou nezávislých experimentů. Ukázáno je relativní množství acetylovaného tubulinu vztaheného na množství tohoto proteinu v kontrolních WT buňkách.



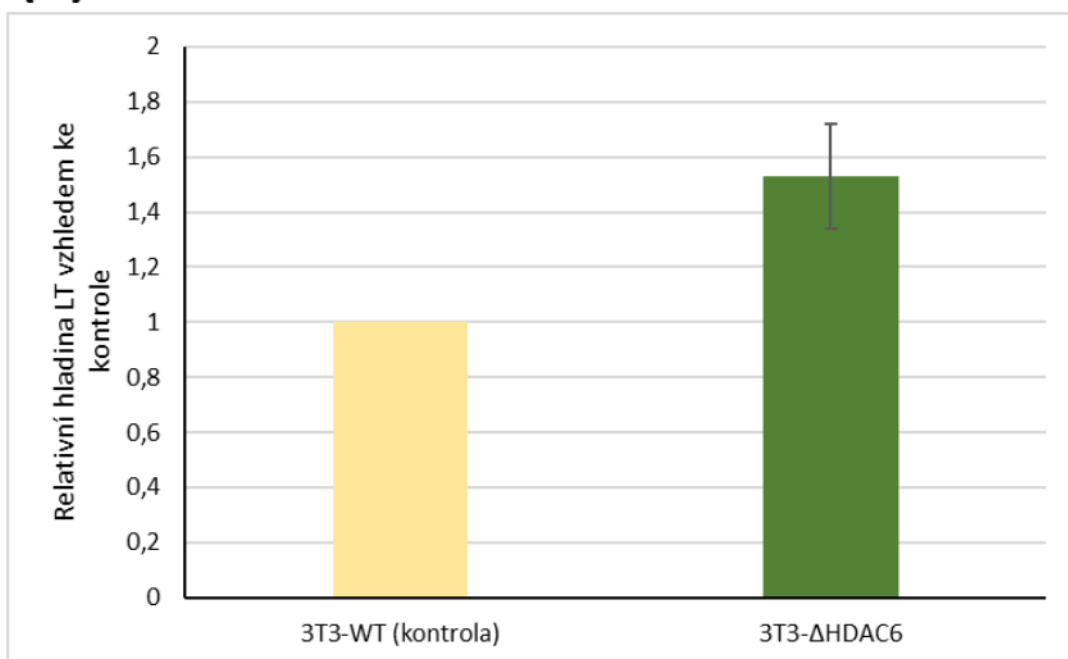
**Obrázek 18: Delece HDAC6 snižuje efektivitu infekce MPyV.** Buňky linie 3T3-ΔHDAC6 a 3T3-WT byly infikovány MPyV s  $\text{moi}=1$ . Buňky byly fixovány 24 hpi a specifickými protilátkami byl detekován LT antigen. Pozitivní buňky byly spočítány pomocí fluorescenční mikroskopie. Hodnoty v grafu představují relativní množství infikovaných buněk vzhledem ke kontrole a reprezentují průměrnou hodnotu z 30 optických polí (cca 1400 buněk) ze tří nezávislých experimentů. +/- sd.

Dále nás zajímalo, jestli HDAC6 ovlivňuje stabilitu a produkci virových proteinů v pozdní fázi infekce, proto jsme sledovali hladiny virových proteinů LT a VP1 u buněk 3T3-ΔHDAC6 a 3T3-WT infikovaných MPyV. Oba typy buněk byly infikovány MPyV s vysokou multiplicitou ( $\text{moi}=10$ ), aby byla zajištěna infekce všech buněk. Buňky byly lyzovány 40 hodin po infekci, proteiny byly separovány SDS elektroforézou a přeneseny na membránu. Specifickými protilátkami byl značen virový LT antigen a buněčný protein GAPDH, respektive strukturní protein VP1 a GAPDH. Množství jednotlivých proteinů v lyzátech bylo stanoveno analýzou western blotů. Překvapivě, v buňkách, které postrádají HDAC6, bylo detekováno zhruba 1,5x vyšší množství LT antigenu než v buňkách kontrolních (obrázek 19). Také u proteinu VP1 jsme detekovali změny v produkci, ale na rozdíl od LT antigenu, se množství VP1 proteinu detekovaného v 3T3-ΔHDAC6 buňkách signifikantně snížilo oproti WT buňkám (obrázek 20). Buňky bez HDAC6 produkovali zhruba o polovinu méně hlavního strukturního proteinu VP1 než buňky kontrolní.

**(A)**



**(B)**

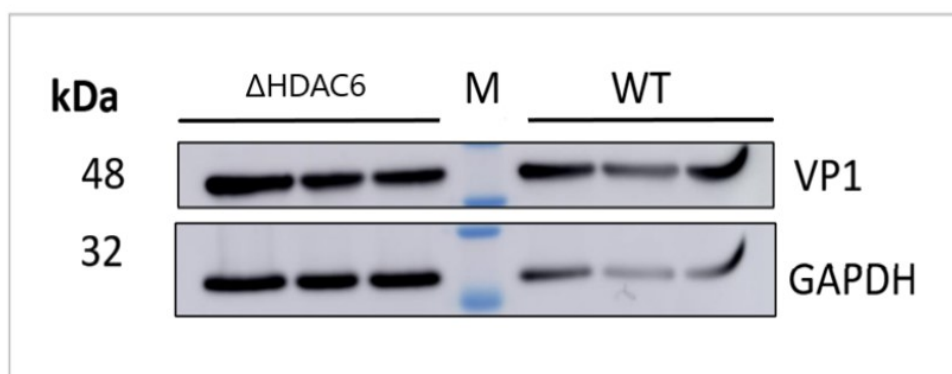


**Obrázek 19: Množství časného virového proteinu LT se v buňkách s chybějící HDAC6 oproti kontrole zvyšuje.**

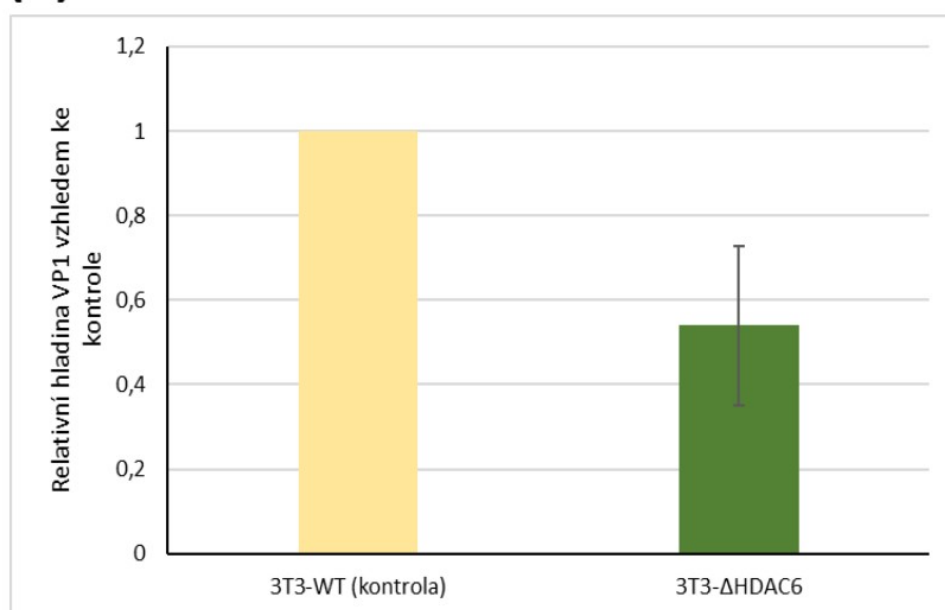
**(A)** Buňky 3T3-ΔHDAC6 a 3T3-WT (kontrola) byly infikovány MPyV (moi=10). Buňky byly inkubovány 40h a po této době lyzovány, lyzáty byly separovány na SDS-PAGE a přeneseny na membránu. Proteiny LT a GAPDH byly značeny specifickými protilátkami. **(B)** Grafické znázornění denzitometrické analýzy digitálních snímků western blotů ukazuje relativní množství proteinu LT vztahované na množství tohoto proteinu v kontrolních buňkách. Hodnoty v grafu reprezentují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů. +/- sd.



**(A)**



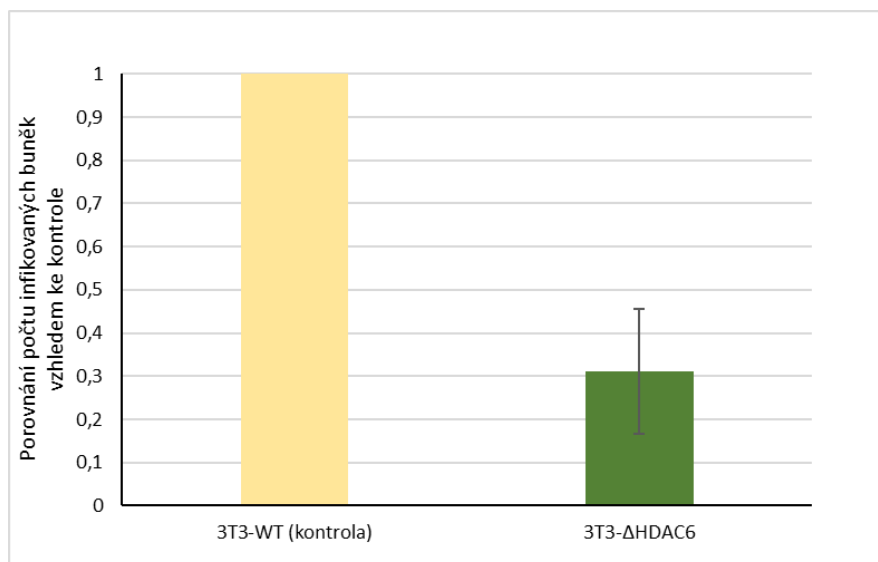
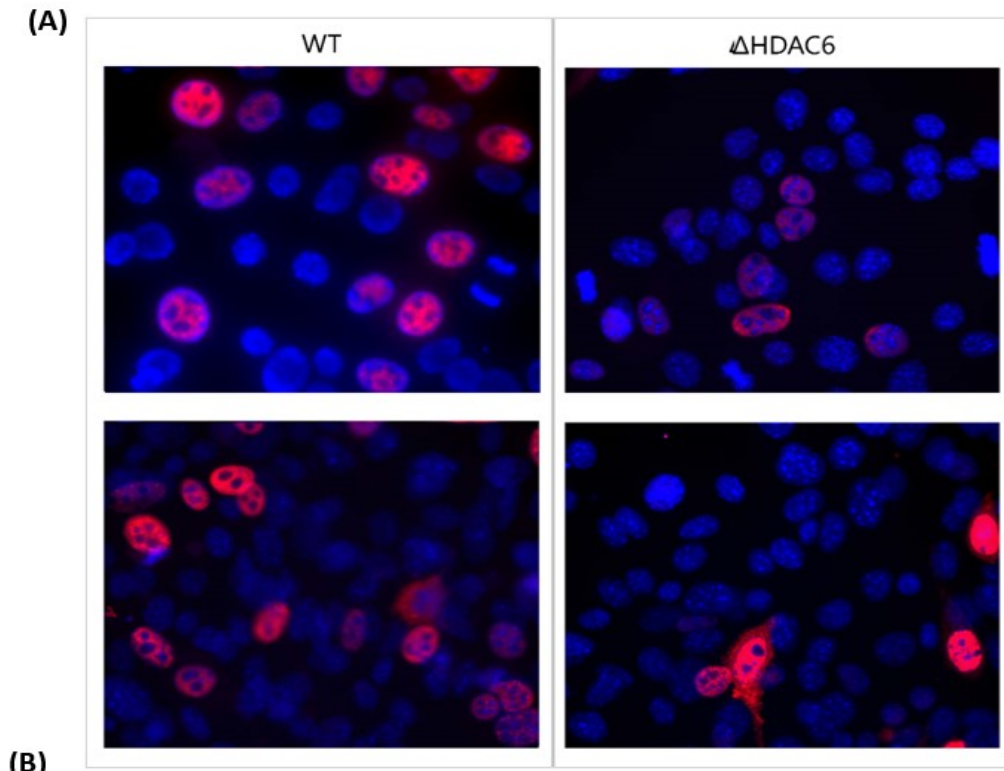
**(B)**



**Obrázek 20: Množství virového strukturního proteinu VP1 se v buňkách s chybějící HDAC6 oproti kontrole snižuje. (A)** Buňky 3T3- $\Delta$ HDAC6 a 3T3-WT (kontrola) byly infikovány MPyV (moi=10). Buňky byly inkubovány 40h a po této době lyzovány, lyzáty byly separovány na SDS-PAGE, přeneseny na membránu a proteiny VP1 a GAPDH byly značeny specifickými protilátkami. **(B)** Grafické znázornění densitometrické analýzy digitálních snímků western blotů ukazuje relativní množství proteinu VP1 vztaženého na množství tohoto proteinu v kontrolních buňkách. Hodnoty v grafu reprezentují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů. +/- sd.

Naše výsledky ukazují, že v absenci HDAC6 sice dochází k poklesu množství infikovaných buněk, nicméně vyšší hladina LT proteinu, a naopak nižší hladina VP1 detekovaná v infikovaných 3T3-ΔHDAC6 buňkách naznačuje, že dochází k poměrně výrazné změně poměrů hladin virových proteinů. Jelikož protein VP1 je hlavní strukturní protein vytvářející virovou kapsidu, lze usuzovat, že při jeho nižší produkci v buňkách 3T3-ΔHDAC6 se logicky bude v těchto buňkách skládat a posléze uvolňovat méně virových partikulí. Předpokládali jsme tedy, že disproporční změna poměrů virových proteinů v absenci HDAC6 může dále vést ke snižování infekitivity nově vzniklých virových částic. Tuto hypotézu jsme se rozhodli ověřit sledováním infekitivity nově produkovaných virových částic z buněk postrádajících HDAC6.

Buňky 3T3-ΔHDAC6 a 3T3-WT byly infikovány MPyV ( $\text{moi}=10$  pfu/b) a 48 hpi bylo z buněk odebráno médium, do kterého se z buněk uvolnily nově produkované virové částice. Takto získaným infekčním médiem byly infikovány permissivní buňky 3T6, které byly 24 hpi buňky fixovány a specifickými protilátkami byl označen LT antigen. Počet infikovaných (LT pozitivních) buněk v každém vzorku byl určen pomocí fluorescenčního mikroskopu. Průměrný počet infikovaných buněk 3T6 byl vztažen k počtu původně infikovaných buněk 3T3 (ΔHDAC6 nebo WT), ze kterých byl virus odebrán a relativní počet LT pozitivních 3T6 buněk infikovaných virem z obou typů buněk 3T3 byl vynesena v grafu (obrázek 21). Infektivita MPyV produkovaného v buňkách 3T3-ΔHDAC6 byla o 69% nižší než u virových částic získaných z kontrolních buněk 3T3-WT.



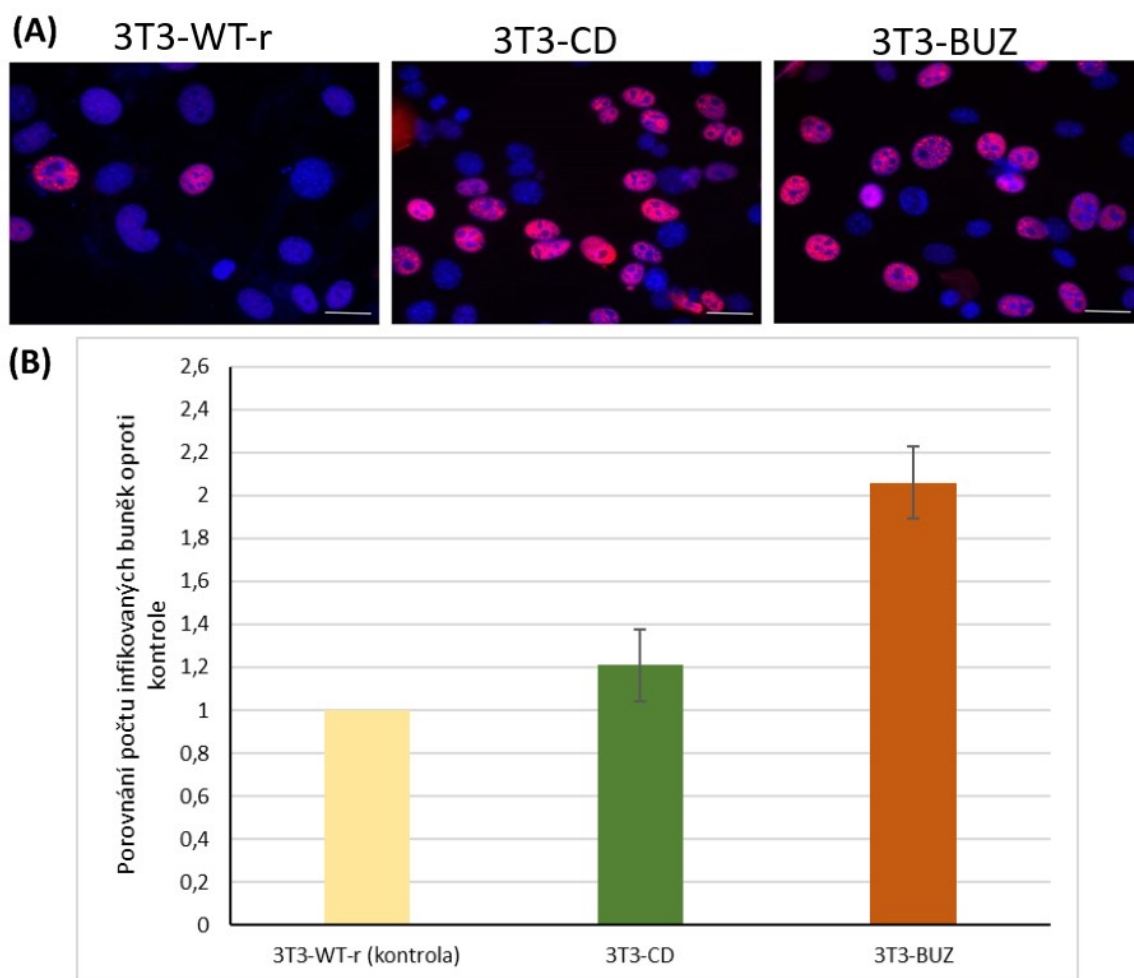
**Obrázek 21: Delece HDAC6 snižuje množství produkovaných infekčních partikulí.** Buňky linie 3T3- $\Delta$ HDAC6 a 3T3-WT byly infikovány MPyV s  $\text{moi}=10$ . 48hpi bylo z buněk odebráno infekční médium, kterým byly infikovány buňky 3T6. 24hpi byly buňky fixovány a specifickými protilátkami byl detekován LT antigen. Pozitivní buňky byly spočítány pomocí fluorescenční mikroskopie. **(A)** Fluorescenční snímky ilustrují porovnání počtu LT pozitivních 3T6 buněk infikovaných virem produkovaným v  $\Delta$ HDAC6 nebo WT buňkách. LT antigen je značen červeně. Buněčná jádra (modře) jsou nespecificky barvena DAPI. **(B)** Průměrný počet infikovaných buněk 3T6 byl vztažen k počtu původně infikovaných buněk 3T3 ( $\Delta$ HDAC6 nebo WT). Hodnoty v grafu představují relativní množství infikovaných buněk vzhledem ke kontrole a reprezentují průměrnou hodnotu z 30 optických polí (cca 1400 buněk) ze tří nezávislých experimentů. +/- sd.

Pozorovali jsme, že jak inhibice HDAC6 tubacinem, tak i její genetické vyřazení, v buňkách vykazují negativní účinky na replikační cyklus MPyV. V buňkách s inhibicí HDAC6 dochází zaprvé ke snížení počtu infikovaných buněk, zadruhé ke změně produkce virových proteinů a za třetí, tyto buňky produkují méně infekčních partikulí. Můžeme tedy shrnout, že HDAC6 je buněčným proteinem, jehož běžné hladiny v buňkách pomáhají MPyV k produktivní infekci.

#### 5.1.6 Vliv jednotlivých domén HDAC6 na efektivitu infekce MPyV

HDAC6 je unikátní buněčnou deacetylázou díky svým dvěma funkcím. Kromě dvou evolučně konzervovaných katalytických domén zodpovědných za deacetylaci (DC) má HDAC6 ještě třetí ZnF-ubiquitin vazebnou doménu (BUZ). HDAC6 je tedy nejen cytoplazmatickou deacetylázou, ale také proteinem regulujícím metabolismus proteinů a ovlivňující jejich degradaci. Naše výsledky ukazují, že HDAC6 také významně ovlivňuje průběh polyomavirové infekce. Dále jsme se zajímali o to, která z funkcí HDAC6 je nezbytná pro replikační cyklus MPyV. Abychom mohli sledovat vliv jednotlivých funkcí HDAC6 na průběh infekce, použili jsme buňky s defektní HDAC6, které jsme získali od profesora Matthiase. Jednak se jednalo o buňky 3T3-BUZ, které byly připraveny z buněk 3T3-ΔHDAC6 zpětným vnesením HDAC6 mutované v doméně pro vazbu ubiquitinu. Mutanty 3T3-BUZ mají tedy pouze deacetylační funkci. Obdobným způsobem byly připraveny i buňky 3T3-DC, které mají naopak funkční pouze ubiquitin-vazebnou doménu. Kontrolní buňky 3T3-WT-r opět pocházejí z linie 3T3-ΔHDAC6, avšak byla v nich reintrodukována exprese kompletně funkční HDAC6.

Jako první jsme opět testovali efektivitu infekce těchto buněčných linií. Buňky 3T3-BUZ, 3T3-CD i 3T3-WT-r byly infikovány MPyV ( $\text{moi}=1$ ), 24 hpi byly buňky fixovány a byl označen LT antigen metodou nepřímé imunofluorescence. Počet infikovaných buněk v každém vzorku byl určen pomocí fluorescenčního mikroskopu. Vzhledem k rozdílné rychlosti růstu buněčných linií byl počet infikovaných buněk vztažen k celkovému počtu (obrázek 22). Překvapivě 3T3-BUZ i 3T3-DC vykazovaly vyšší efektivitu infekce než buňky kontrolní, konkrétně jsme zaznamenali 2,06 x vyšší efektivitu infekce u buněk 3T3-BUZ a 1,21x vyšší efektivitu infekce u 3T3-DC buněk v porovnání s kontrolními buňkami.



**Obrázek 22: Defekt v enzymatické aktivitě HDAC6 vede v buňkách 3T3 k vyšší míře infekce MPyV.** Buňky linie 3T3-CD, 3T3-BUZ a 3T3-WT-r byly infikovány MPyV s  $\text{moi}=1$ . Buňky byly fixovány 24 hpi a specifickými protilátkami byl detekován LT antigen. Pozitivní buňky byly spočítány pomocí fluorescenční mikroskopie. **(A)** LT antigen je znázorněn červenou barvou. Deoxyribonukleová kyselina byla nespecificky značena DAPI (modře). Měřítka v levém dolním rohu značí 15  $\mu\text{m}$ . **(B)** Hodnoty v grafu představují relativní množství  $1 \times 10^5$  infikovaných buněk vzhledem ke kontrole a reprezentují průměrnou hodnotu z 30 optických polí (cca 1400 buněk) ze tří nezávislých experimentů.  $\pm$  sd.

Abychom určili, jestli funkce jednotlivých domén HDAC6 ovlivňuje množství virových proteinů, tak jsme obdobně jako u buněk 3T3-ΔHDAC6 sledovali hladiny virových proteinů LT a VP1 v pozdní fázi infekce.

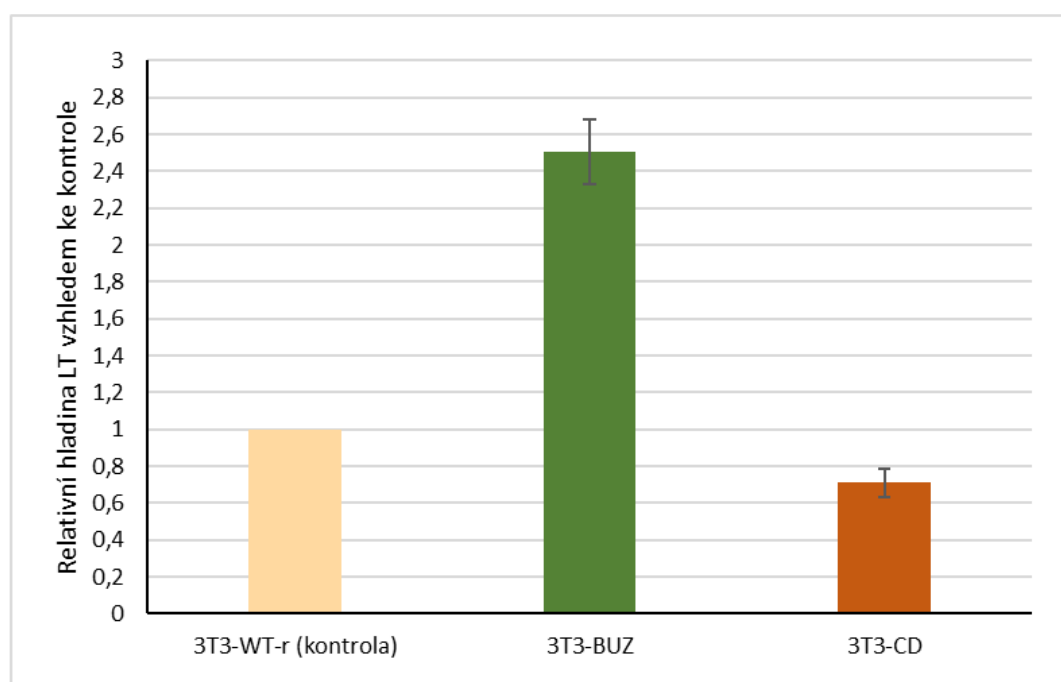
Všechny typy buněk byly a infikovány MPyV s vysokou multiplicitou ( $\text{moi}=10$ ). Buňky byly lyzovány 40 hodin po infekci, proteiny separovány SDS elektroforézou a přeneseny na membránu. Specifickými protilátkami byly značeny virové proteiny LT a VP1 a buněčný GAPDH. Množství jednotlivých proteinů v lyzátech bylo stanoveno analýzou western blotů.

V buňkách 3T3-BUZ bylo detekováno vyšší množství jak časného LT antigenu (2,4x více), tak i pozdního VP1 proteinu (2,5x více) oproti kontrolním buňkám. Naopak u mutanty 3T3-CD bylo množství obou virových proteinů nižší než v kontrolních buňkách. Byl pozorován pokles hladiny LT na 70% hodnoty kontrolních buněk a u VP1 proteinu to byl pokles 80% (obrázek 24 a 25). Z výsledků můžeme pozorovat kromě změn v množství virových proteinů, také konsistenci jejich poměrů v rámci jednotlivých mutant. U buněk 3T3-ΔHDAC6 jsme popisovali zásadní změny v poměru virových proteinů, kdy se množství LT proteinu zvyšovalo, ale VP1 naopak oproti kontrole ubyl. Nicméně takový trend se u buněk defektních v jednotlivých funkčních doménách HDAC6 neprojevil. Naopak pokud se množství jednoho virového proteinu snížilo, bylo tomu tak i u proteinu druhého a vice versa.

**(A)**



**(B)**

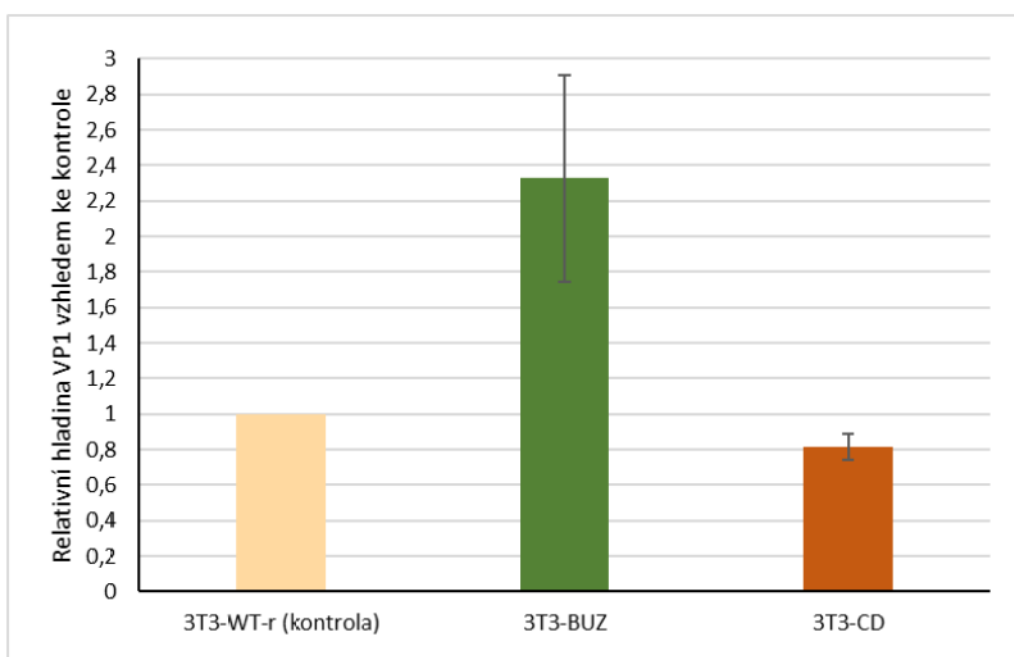


**Obrázek 23: Množství časného virového proteinu LT se mění v buňkách s defektní HDAC6. (A)** Buňky 3T3-WT-r (kontrola), 3T3-BUZ a 3T3-CD byly infikovány MPyV (moi=10). Buňky byly inkubovány 40h a po této době lyzovány, lyzáty byly separovány na SDS-PAGE a přeneseny na membránu. Proteiny LT a GAPDH byly značeny specifickými protilátkami. **(B)** Grafické znázornění denzitometrické analýzy digitálních snímků western blotů ukazuje relativní množství proteinu LT vztaženého na množství tohoto proteinu v kontrolních buňkách. Hodnoty v grafu reprezentují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů. +/- sd.

**(A)**



**(B)**

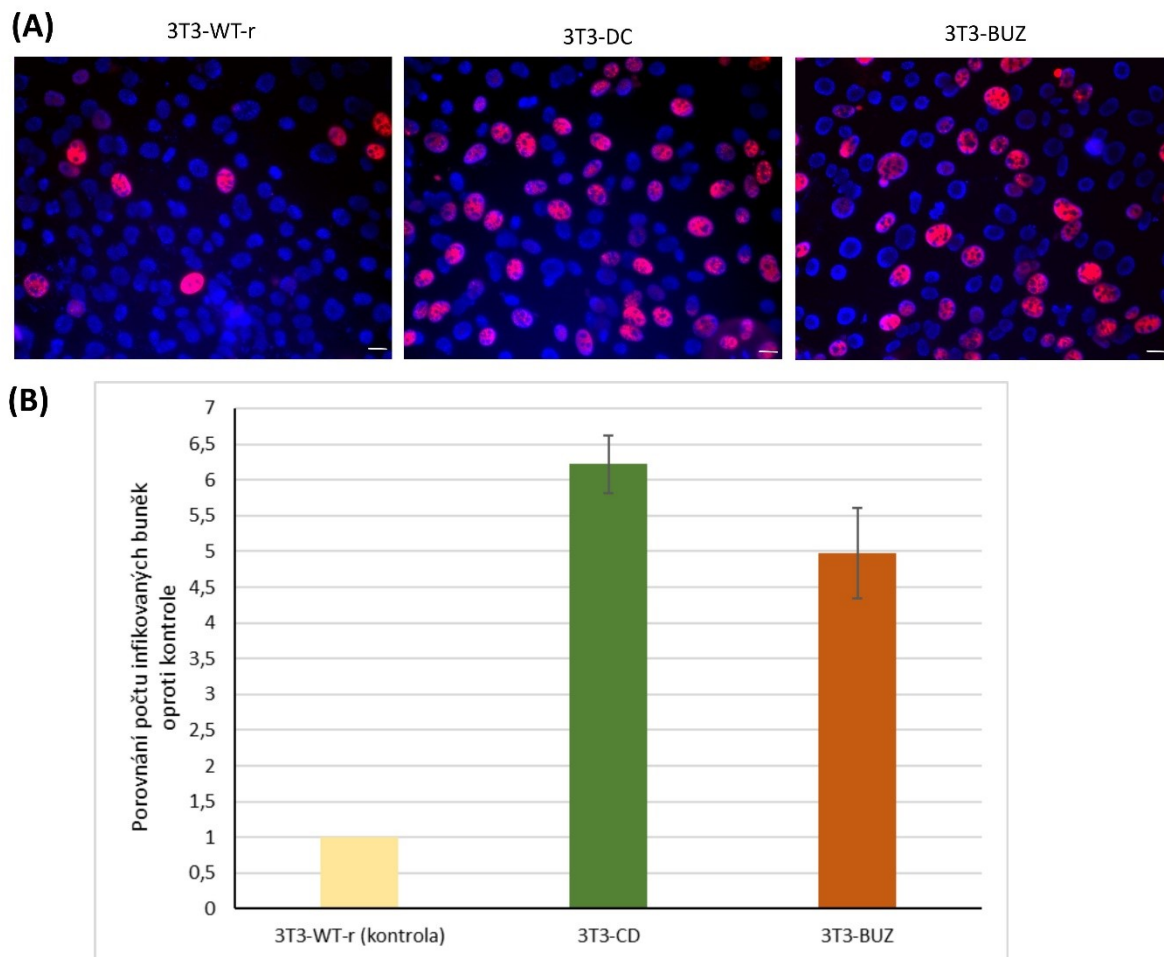


**Obrázek 24: Množství virového strukturního proteinu VP1 se mění v buňkách s defektní HDAC6 oproti kontrole. (A)** Buňky 3T3-WT-r (kontrola), 3T3-BUZ a 3T3-CD byly infikovány MPyV (moi=10). Buňky byly inkubovány 40h a po této době lyzovány, lyzáty byly separovány na SDS-PAGE a přeneseny na membránu. Proteiny VP1 a GAPDH byly značeny specifickými protilátkami. **(B)** Grafické znázornění denzitometrické analýzy digitálních snímků western blotů ukazuje relativní množství proteinu VP1 vztažené na množství tohoto proteinu v kontrolních buňkách. Hodnoty v grafu reprezentují průměrnou hodnotu ze tří nezávislých experimentů. +/- sd.



Nakonec nás zajímalo, jestli trend ve změnách hladin virových proteinů se projeví i v množství infekčního viru produkovaného jednotlivými liniemi. Buňky 3T3-BUZ, 3T3-CD a 3T3-WT-r byly infikovány MPyV ( $\text{moi}=10$  pfu/b). 48 hpi bylo z buněk odebráno médium, do kterého se z buněk uvolnily nově produkované virové částice. Takto získaným infekčním médiem byly infikovány permissivní buňky 3T6, které byly 24 hpi fixovány a specifickými protilátkami byl označen LT antigen. Počet infikovaných (LT pozitivních) buněk v každém vzorku byl určen pomocí fluorescenčního mikroskopu. Průměrný počet infikovaných buněk 3T6 byl vztažen k počtu infikovaných buněk 3T3 (BUZ, CD nebo WT-r), ze kterých byl virus odebrán. Množství infekčního viru bylo výrazně vyšší u viru získaného z buněk 3T3-BUZ, ale překvapivě i z buněk 3T3-CD v porovnání s množstvím infekčních částic získaných z kontrolních buněk 3T3-WT-r.

Výsledek získaný z buněk 3T3-BUZ odpovídá našemu očekávání, kdy vyřazení funkce ubiquitin-vazebné domény vede k akumulaci proteinů, které by ve WT buňkách byly zachyceny HDAC6 a následně degradovány v proteazómu. V BUZ buňkách jsme detekovali vyšší hladiny jak LT antigenu, tak i VP1 proteinu a zároveň tyto buňky produkovaly i více virového potomstva (obrázek 25). Naopak výsledek získaný z buněk 3T3-DC je poněkud nečekaný, protože mutace v katalytických doménách HDAC6 by měla vést k vyšší acetylaci VP1 a hyperacetylaci VP1 by měla mít na infektivitu virového potomstva spíše negativní vliv.



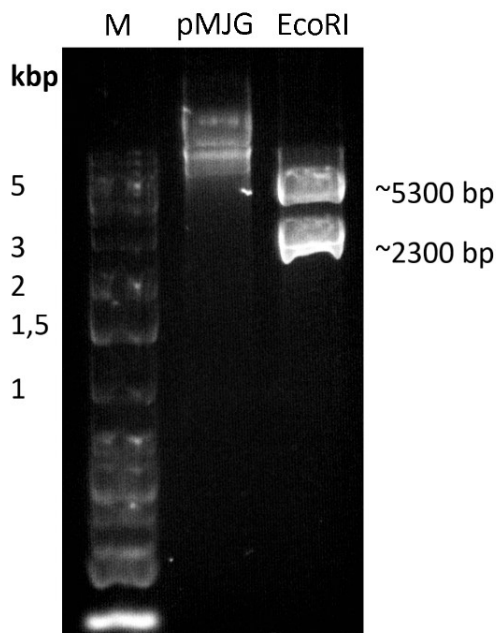
**Obrázek 25: Buňky s pouze 1 funkční enzymatickou aktivitou HDAC6 produkují více infekčních partikulí než buňky kontrolní.** Buňky linie 3T3-BUZ, 3T3-CD a 3T3-WT-r byly infikovány MPyV s  $\text{moi}=10$ . 48hpi bylo z buněk odebráno infekční médium, kterým byly infikovány buňky 3T6. 24hpi byly buňky 3T6 fixovány a specifickými protilátkami byl detekován LT antigen. Pozitivní buňky byly spočítány pomocí fluorescenční mikroskopie. **(A)** Fluorescenční snímky ilustrují porovnání počtu LT pozitivních 3T6 buněk infikovaných virem produkovaným v BUZ, CD nebo WT-r buňkách. LT antigen je značen červeně. Buněčná jádra (modře) jsou nespecificky barvena DAPI. **(B)** Průměrný počet infikovaných buněk 3T6 byl vztažen k počtu původně infikovaných buněk 3T3. Hodnoty v grafu představují relativní množství infikovaných buněk vzhledem ke kontrole a reprezentují průměrnou hodnotu z 30 optických polí (cca 1400 buněk) ze tří nezávislých experimentů.  $\pm$  sd.

## 5.2 Příprava expresních plazmidů a buněčných linií pro studium vlivu HDAC6 na tumorigenezi indukovanou polyomaviry

V druhé části projektu byla řešena hypotéza týkající se vlivu HDAC6 na tumorigenezi nádorů indukovaných polyomaviry. Naším záměrem bylo testovat transformační schopnosti časných antigenů polyomavirů v buňkách s deletovaným genem pro HDAC6 a porovnat ji s buňkami kontrolními. K buněčné transformaci u polyomavirů je nezbytná přítomnost genových produktů kódovaných časnou oblastí polyomavirového genomu. Proto byly připraveny expresní plazmidy nesoucí časné kódující oblasti genomů MPyV a BKPyV. Konstrukty byly navrženy tak, aby co nejlíže mimikovaly situaci v infikované buňce. Pod kontrolu silného eukaryotického promotoru byla vložena celá časná kódující oblast genomu BK viru nebo MPyV a zároveň byla zachována místa pro sestřih. Předpokládali jsme, že tímto způsobem nejenom zajistíme expresi všech časných antigenů BK viru (LT a ST) nebo MPyV (LT, MT a ST), ale zároveň i to, že budou v buňce přítomny v poměru podobném jako v infikované buňce.

### 5.2.1 Příprava expresního plazmidu pEF1-MPyV-early

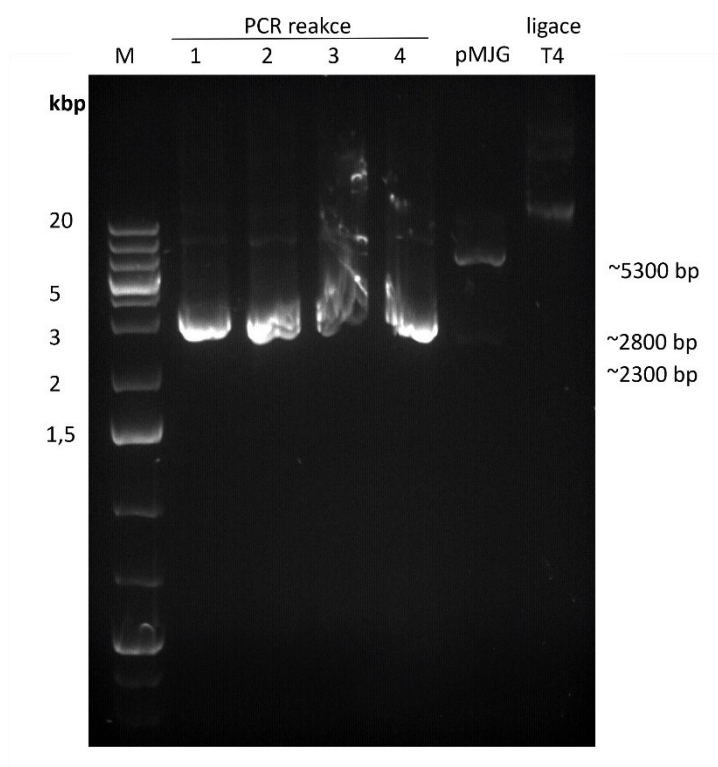
Pro zjištění vlivu HDAC6 na buněčnou transformaci indukovanou časnými virovými proteiny MPyV bylo nutné připravit plazmid exprimující najednou všechny T antigeny kódované v časné oblasti genomu MPyV. Pro přípravu cílového expresního plazmidu pEF1-MPyV-early byl jako zdroj DNA využit plazmid pMJG nesoucí celý genom MPyV (5307 bp). Bohužel, časná oblast MPyV genomu je v tomto plazmidu přerušena sekvencí bakteriálního vektoru, proto jsme nejprve museli připravit re-cirkularizovaný virový genom obsahující intaktní sekvenci časné oblasti. Komerční soupravou byl izolován plazmid pMJG, který byl restriční endonukleázou EcoRI štěpen za vzniku virového genomu MPyV (5300 bp) a bakteriálního plazmidu (2300 bp). Efektivita restričního štěpení byla ověřena separací fragmentů agarózovou elektroforézou (obrázek 26).



**Obrázek 26: Restrikční štěpení plazmidu pMJG endonukleázou EcoRI.** Fragmenty DNA byly separovány v 1% agarózovém gelu. Byly detekovány proužky odpovídající velikosti neštěpeného plazmidového konstrutu pMJG (~8000 bp), linearizovaného virového genomu (~5300 bp) a linearizované kostře plazmidu (~2300 bp). M – marker molekulových vah

Štěpená DNA byla přečištěna a koncentrována srážením a linearizované fragmenty DNA byly následně re-cirkulárizovány T4 DNA ligázou tak, aby se upřednostnila intramolekulární ligace molekuly před ligací konců dvou různých linearizovaných genomů a opětovnému vzniku původního vektoru. Ligační směs byla koncentrována a přečištěna srážením a úspěšnost ligace byla ověřena na agarové DNA elektroforéze (obrázek 27). I když jsme detekovali pouze širokou škálu násobně ligovaných genomů, vektorů a jejich kombinací, byly cirkularizované genomy použity jako templát pro PCR reakci. Časná oblast genomu MPyV (nukleotidy 175-2991, dle

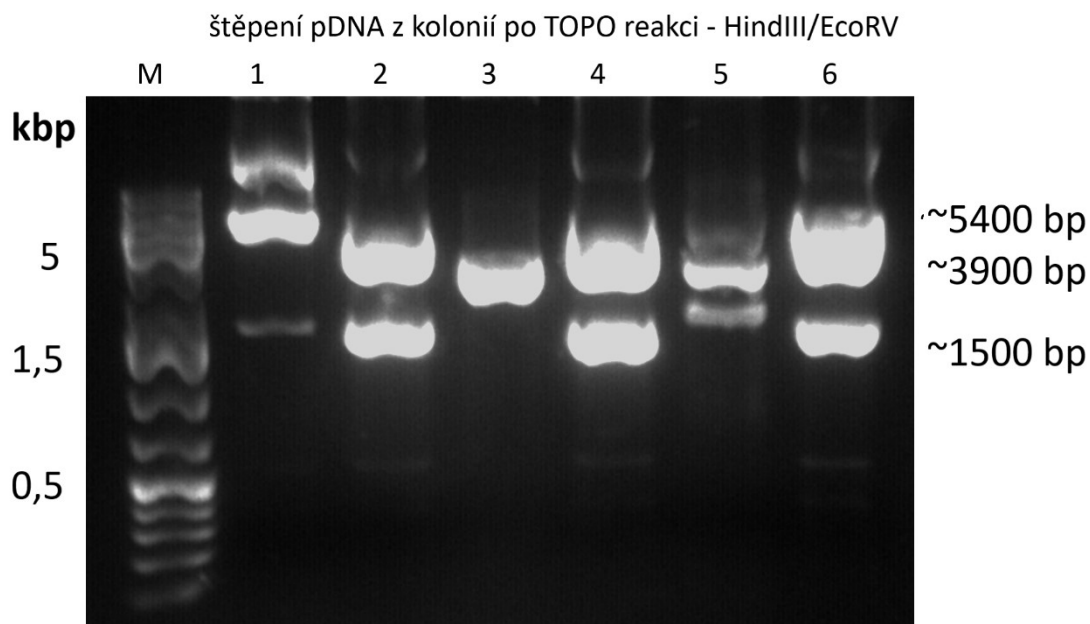
číslování MPyV genomu) byla amplifikována PCR a výsledné PCR produkty o velikosti 2800 bp byly detekovány na elektroforetogramu (obrázek 27).



**Obrázek 27: Produkty ligace a PCR reakce.** Fragменты DNA были разделены в 1% агарозовом геле. Были детекованы амплифицированные DNA фрагменты (образцы 1 - 4) соответствующие величине часной области геному MPyV (~2800 bp). В дорожке щепённого плазмиду pMJG (pMJG) был детекован фрагмент соответствующий величине линейизованного MPyV геному (5300 bp) и величине линейизованного бактериального плазмиду (2300 bp). Ligace T4 – лигацiйный смес containing multiple лигированные геномы. M – маркер молекуловых ваh

PCR produkt byl přečištěn komerční soupravou High Pure Purification Kit (Roche) a následně vložen pomocí komerční soupravy pro TOPO® klonování in vitro do vektoru pENTR-D-TOPO za vzniku donorového vektoru pENTR-MPyV-early (5401 bp). Vzniklým plazmidem byly transformovány pomocí teplotního šoku bakterie *E. coli*. Transformované bakterie byly vysety na misky s pevným médiem obohaceným o selekční antibiotikum kanamycin. 10 jednotlivých kolonií vyrostlých na pevném médiu s kanamycinem bylo zaočkováno do tekutého média a kultivováno. Alkalickou metodou byly z kolonií izolovány plazmidy a přítomnost vloženého fragmentu DNA byla ověřena restrikcí směsí endonukleáz HindIII/EcoRV. Výsledek štěpení byl ověřen separací restrikčních směsí na DNA elektroforéze (obrázek 28). Pokud došlo ke vložení cílové sekvence do plasmidu, očekávali jsme, že detekujeme fragmenty o velikosti 3940bp a 1462 bp. Na provedené agarózové elektroforéze byly detekované fragmenty DNA, které

velikostí odpovídaly předpokládaným fragmentům, u kolonií 2, 4 a 6. Dále jsme detekovali fragmenty, které svou velikostí odpovídali celému neštěpenému plazmidu (5401 bp) či samotnému plazmidovému vektoru pENTR/D TOPO (2300 bp). Přítomnost a celistvost vložené sekvence v plazmidech izolovaných z kolonie 2, 4 a 6 byla dále potvrzena sekvenací plazmidu.

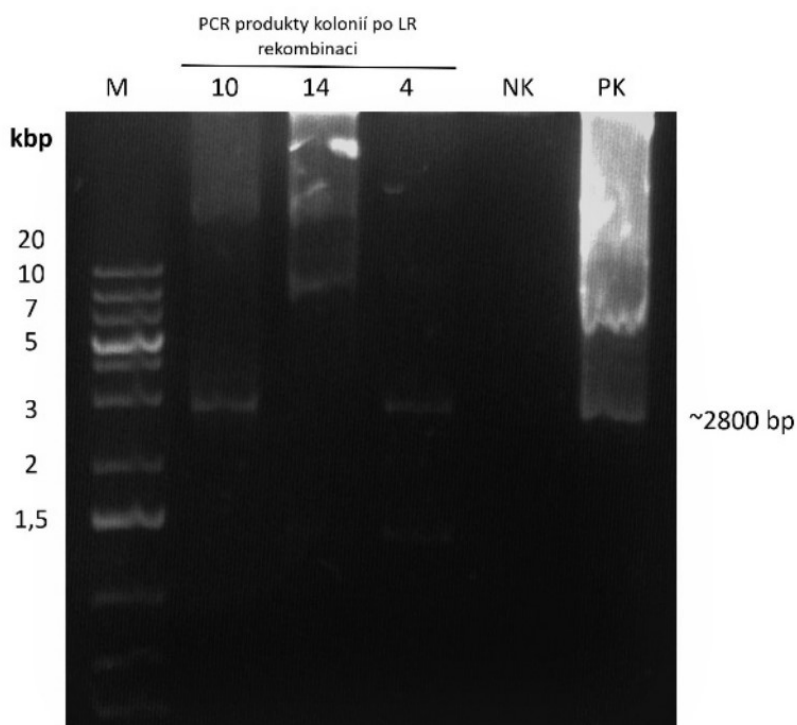


**Obrázek 28: Produkty TOPO klonovací reakce štěpené směsí restričních endonukleáz EcoRV/HindIII.**

Fragmenty DNA byly separovány v 1% agarózovém gelu. Na elektroforetogramu byly po TOPO transformační reakci a štěpení detekovány proužky různých velikostí. Proužky o přibližné velikosti 5400 bp odpovídají velikosti neštěpeného plazmidu, dále byly detekovány fragmenty DNA vzniklé štěpením (~4000 bp; 1500 bp), a fragmenty, které odpovídají velikosti plazmidu pENTR (~2300 bp). Pro pokračování přípravy požadovaného expresního plazmidu byly vybrány plazmidy z bakteriální kolonie 2, 4 a 6. M – marker molekulových vah

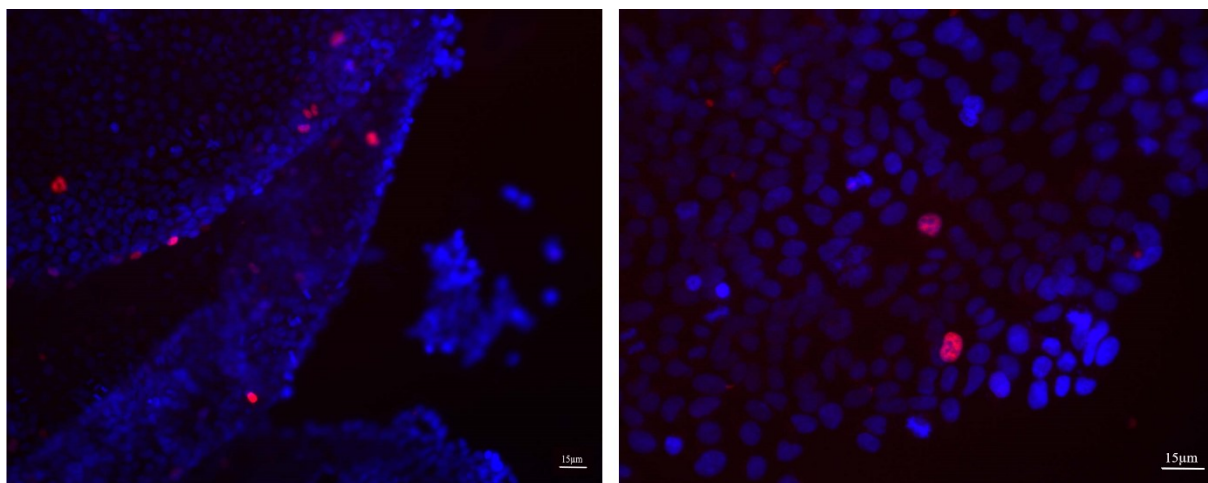
Přenos oblasti nesoucí geny našeho zájmu z pENTR-MPyV-early donorového vektoru do cílového expresního vektoru byl proveden LR rekombinací. Časná oblast MPyV byla vyštěpena z donorového vektoru a integrována do cílového plazmidu pEF1-DEST51, který je vhodný pro expresi proteinů v savčích buňkách. Takto byl připraven expresní plazmid pEF1-MPyV-early (8616 bp). Tento výsledný plazmid si zachoval rezistenci k ampicilinu, ale na rozdíl od rodičovského plazmidu pEF1-DEST51 ztratil rezistenci k chloramfenikolu (sekvence zajišťující rezistenci k chloramfenikolu je při rekombinaci vyměněna za sekvenci našeho zájmu). Rekombinovaný plazmid byl poté transformován pomocí elektrického pulzu do kompetentních bakterií. Bakterie byly vysety na plotny s pevným médiem obsahujícím antibiotikum ampicilin. Narostlé monoklonie byly posléze přeneseny na nové ampicilinové

plotny a zároveň plotny obsahující kromě ampicilinu i antibiotikum chloramfenikol. Negativní selekcí byly vybrány kolonie (bez rezistence na chloramfenikol), které byly dále kultivovány v tekutém médiu, aby z nich posléze byla izolována plazmidová DNA expresního plazmidu pEF1-MPyV-early. Přítomnost sekvence časně oblasti MPyV v izolovaných plazmidech byla ověřena amplifikací dané sekvence metodou PCR. Výsledek amplifikace byl ověřen agarózovou elektroforézou. Na elektroforetogramu (obrázek 29) byly detekovány v reakcích obsahujících plazmidy z kolonií 10 a 4 proužky o velikosti ~2800 bp, což odpovídá velikosti časně kódující oblasti MPyV. S plazmidy izolovanými z těchto kolonií bylo tedy dále pracováno.



**Obrázek 29: Produkty PCR reakce plazmidů pEF1-MPyV-early.** Fragmenty DNA byly separovány v 1% agarózovém gelu. Na elektroforetogramu byly u kolonií číslo 10 a 4 detekovány fragmenty DNA o velikosti 2800 bp. M- marker molekulových vah NK – bez templátová kontrola PCR reakce; PK – pozitivní kontrola PCR reakce, jako templát byl použit plazmid pENTR-MPyV-early

Dále jsme ověřovali expresi LT antigenu z připravených plazmidů metodou nepřímé imunofluorescence. Buňky linie 293 byly transfekovány plazmidy, fixovány 24 hodin po transfekci a specifickou protilátkou byl detekován LT antigen. K expresi LT antigenu docházelo pouze z plazmidu izolovaného z kolonie 10 (obrázek 30). Po ověření exprese dalších časných antigenů (MT a ST) bude expresní plazmid použit ke studiu indukce tumorogeneze vyvolané T antigeny myšího viru.

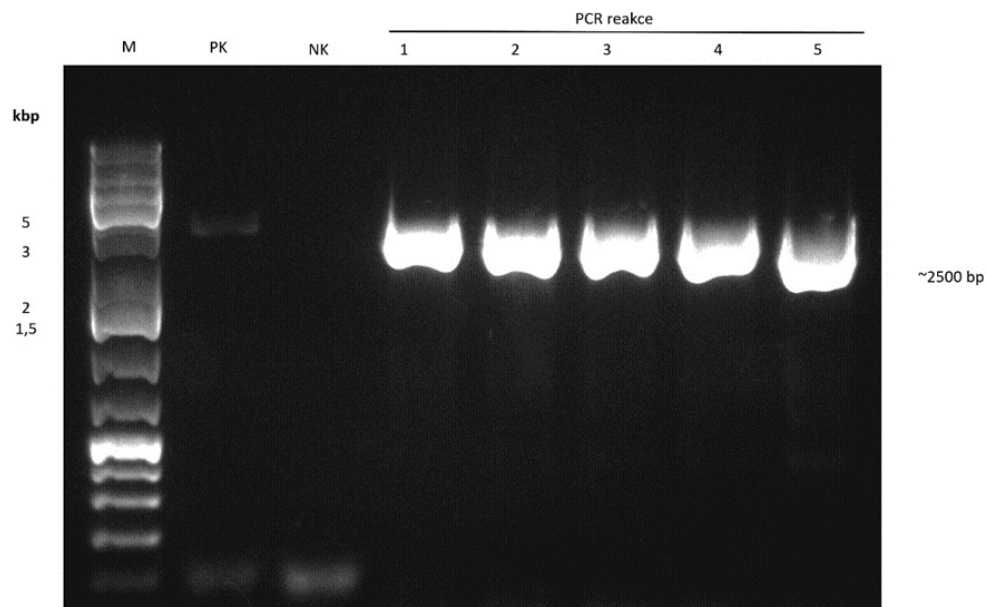


**Obrázek 30: Buňky 293 transfekované plazmidem pEF1-MPyV-early z bakteriální kolonie 10.** Buňky 293 byly transfekovány expresním plazmidem pEF1-MPyV-early. 24 hodin po transfekci byly buňky fixovány a specifickými protilátkami byl detekován LT antigen (červená barva), buněčná jádra jsou značena DAPI (modrá barva). LT pozitivní buňky byly detekovány pomocí fluorescenční mikroskopie.

#### 5.2.2 Příprava expresního plazmidu pEF1-BKPyV-early

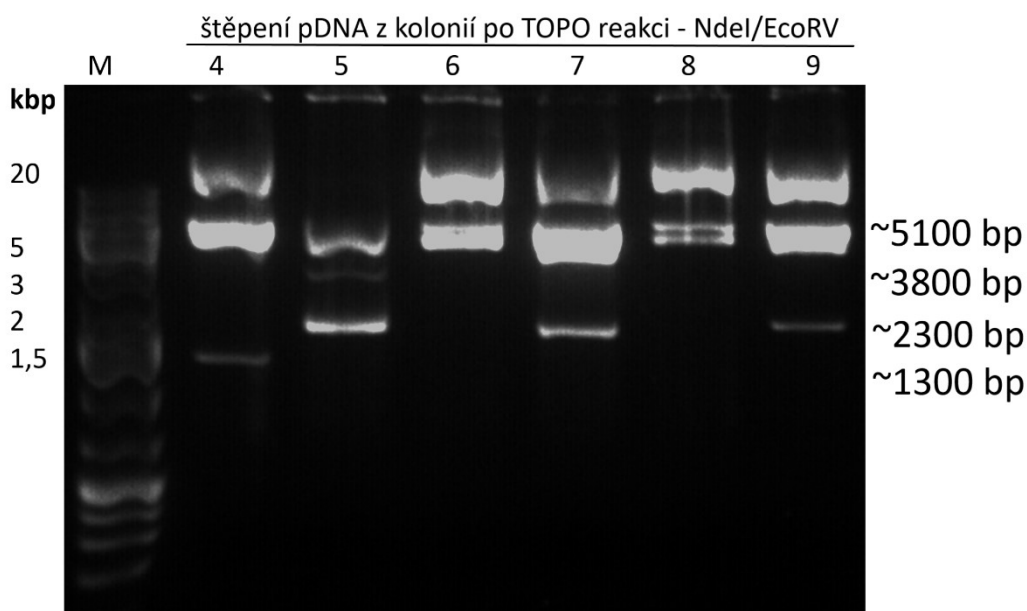
Obdobně jako pro studium vlivu HDAC6 na buněčnou transformaci indukovanou myším polyomavirem, bylo i pro studium vlivu HDAC6 na buněčnou transformaci indukovanou lidským BK virem nutné připravit plazmid exprimující najednou všechny T antigeny kódované v časně oblasti genomu BKPyV. K přípravě cílového expresního plazmidu pEF1-BKPyV-early byl jako zdroj DNA využit plazmid pBKPyV, nesoucí celý genom BK viru (5153 bp). Tento plazmid byl použit jako templát pro PCR reakci. Časná oblast genomu BKPyV (nukleotidy 2640-5153, dle číslování BKPyV genomu) byla amplifikována PCR a výsledné PCR produkty o velikosti 2514 bp byly detekovány na elektroforetogramu (obrázek 31).





**Obrázek 31: Produkty PCR reakce.** Fragmenty DNA byly separovány v 1% agarózovém gelu. Marker molekulových vah je označen M. Byly vizualizovány amplifikované DNA produkty (značeny 1 - 5) odpovídající velikosti časné oblasti genomu BKPyV (~2500 bp). M – marker molekulových vah; NK – bez templátová PCR reakce; PK – pozitivní kontrola PCR reakce, jako templát byl použit plazmid pBKPyV

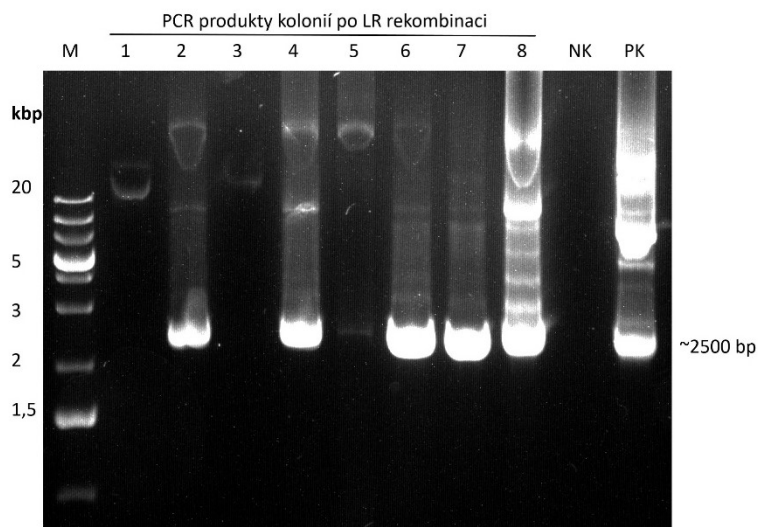
PCR produkt byl přečištěn komerční soupravou High Pure Purification Kit (Roche) a následně vložen pomocí komerční soupravy pro TOPO® klonování in vitro do vektoru pENTR-D-TOPO za vzniku donorového vektoru pENTR-BKPyV-early (5098 bp). Vzniklým plazmidem byly transformovány pomocí teplotního šoku bakterie *E. coli*. Transformované bakterie byly vysety na misky s pevným médiem obohaceným o selekční antibiotikum kanamycin. 10 jednotlivých kolonií vyrostlých na pevném médiu s kanamycinem bylo zaočkováno do tekutého média a kultivováno. Alkalickou metodou byly z kolonií preparovány rekombinantní plazmidy a ty štěpeny směsí restričních endonukleáz NdeI/EcoRV. Pokud došlo ke vložení cílové sekvence do plazmidu, očekávali jsme, že detekujeme fragmenty o velikosti 3862 bp a 1262 bp. Na provedené agarózové elektroforéze byly detekované fragmenty DNA, které velikostí odpovídaly předpokládaným fragmentům, u kolonií 4, 5 a 7 (obrázek 32). Dále jsme detekovali fragmenty, které svou velikostí odpovídali celému neštěpenému plazmidu (5098 bp) či samotnému plazmidovému vektoru pENTR/D TOPO (2300 bp). Přítomnost a celistvost vložené sekvence v plazmidech izolovaných z kolonie 4, 5 a 7 byla dále potvrzena sekvenací plazmidu.



**Obrázek 32: Produkty TOPO klonovací reakce štěpené směsí restrikčních endonukleáz EcoRV/NdeI.** Fragmenty DNA byly separovány v 1% agarózovém gelu. Na elektroforetogramu byly po TOPO transformační reakci a štěpení detekovány proužky různých velikostí. Proužky o přibližné velikosti 5100 bp odpovídají velikosti neštěpeného plazmidu, dále byly detekovány fragmenty DNA vzniklé štěpením (~3800 bp; 1300 bp), a fragmenty, které odpovídají velikosti plazmidu pENTR (~2300 bp). Pro pokračování přípravy požadovaného expresního plazmidu byly vybrány plazmidy z bakteriální kolonie 4, 5 a 7. M – marker molekulových vah.

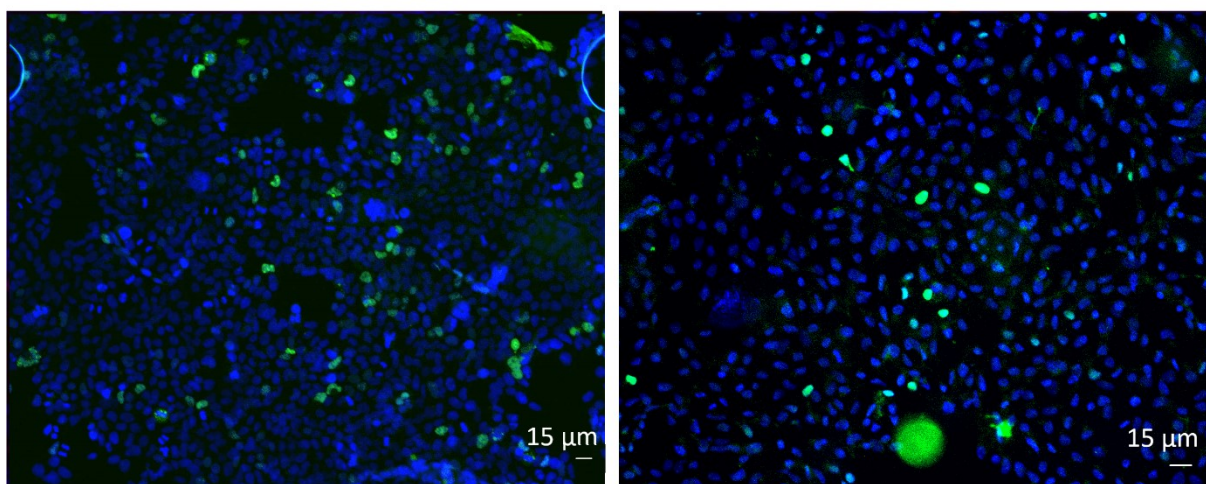
Přenos oblasti nesoucí geny našeho zájmu z pENTR-BKPyV-early donorového vektoru do cílového expresního vektoru byl proveden LR rekombinací. Časná oblast BKPyV byla vyštěpena z donorového vektoru a integrována do cílového plazmidu pEF1-DEST51, který je vhodný pro expresi proteinů v savčích buňkách. Takto byl připraven expresní plazmid pEF1-BKPyV-early. Tento výsledný plazmid si zachoval rezistenci k ampicilinu, ale na rozdíl od rodičovského plazmidu pEF1-DEST51 ztratil rezistenci k chloramfenikolu (sekvence zajišťující rezistenci k chloramfenikolu je při rekombinaci vyměněna za sekvenci našeho zájmu). Rekombinovaný plazmid byl poté transformován pomocí elektrického pulzu do kompetentních bakterií. Bakterie byly vysety na plotny s pevným médiem obsahujícím antibiotikum ampicilin. Narostlé monokolonie byly zaočkovány na nové ampicilinové plotny a zároveň plotny obsahující kromě ampicilinu i antibiotikum chloramfenikol. Negativní selekcí byly vybrány kolonie (bez rezistence na chloramfenikol), které byly dále kultivovány v tekutém médiu, aby z nich posléze byla izolována plazmidová DNA expresního plazmidu pEF1-BKPyV-early. Přítomnost sekvence časně oblasti BKPyV v izolovaných plazmidech byla ověřena amplifikací dané sekvence metodou PCR. Výsledek amplifikace byl ověřen agarózovou elektroforézou. Na

elektroforetogramu (obrázek 33) byly detekovány v reakcích obsahujících plazmidy z kolonií 2, 4, 5, 6, 7 a 8 proužky o velikosti ~2500 bp, což odpovídá velikosti časně kódující oblasti BKPyV. S plazmidy izolovanými z těchto kolonií bylo tedy dále pracováno.



**Obrázek 33: PCR produkty z kolonií po LR rekombinaci.** Fragmenty DNA byly separovány v 1% agarózovém gelu. Na elektroforetogramu byly u kolonií číslo 2, 4, 5, 6, 7 a 8 detekovány fragmenty DNA o velikosti 2500 bp. M – marker molekulových vah NK – bez templátová kontrola PCR reakce; PK – pozitivní kontrola PCR reakce, jako templát byl použit plazmid pENTR-BKPyV-early

Dále jsme ověřovali expresi LT antigenu z připravených plazmidů metodou nepřímé imunofluorescence. Buňky linie 293 byly transfekovány plazmidy, fixovány 24 hodin po transfekci a specifickou protilátkou byl detekován LT antigen (obrázek 34). K expresi LT antigenu docházelo u plazmidů izolovaných z kolonií 2, 5, 7, 6 a 10. Po ověření exprese dalších časných antigenů (MT a ST) budou expresní plazmidy pEF1-BKPyV-early použity ke studiu indukce tumorigeneze vyvolané T antigeny myšího viru.



**Obrázek 34: Buňky 293 transfekované plazmidem pEF1-BKPyV-early z bakteriální kolonie 2 a 5.** Buňky 293 byly transfekovány expresním plazmidem pEF1-BKPyV-early. 24 hodin po transfekci byly buňky fixovány a specifickými protilátkami byl detekován LT antigen (zelená barva), buněčná jádra jsou značena DAPI (modrá barva). LT pozitivní buňky byly detekovány pomocí fluorescenční mikroskopie.

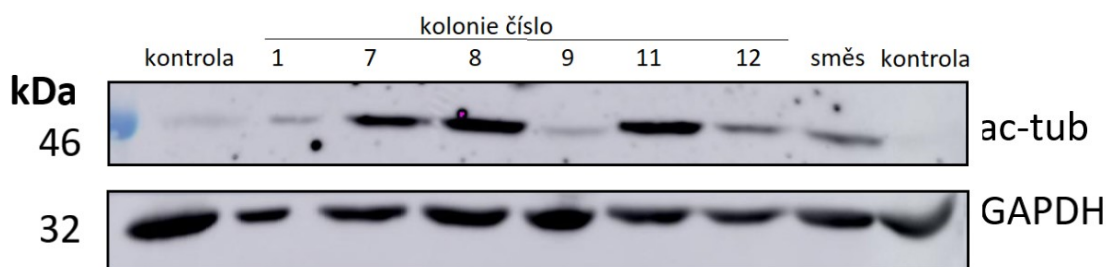
### 5.2.3 Příprava buněk s KO-HDAC6

Kromě expresních plazmidů zajišťujících produkci T antigenů bylo nutné získat buňky bez HDAC6, které budou námi připravenými plazmidy tranfekovány. Myši KO linii 3T3- $\Delta$ HDAC6 se nám podařilo získat ze Švýcarské laboratoře od profesora Matthiase. Nicméně linii lidských buněk s  $\Delta$ HDAC6 jsme museli připravit. Pro tyto účely jsme zvolili vyřazení genu pro HDAC6 z buněk RPTEC/hTERT1 komerčním systémem CRISPR-Cas 9.

V první části jsme testovali, zda je vůbec možné linii RPTEC/hTERT1 efektivně transfekovat. Pro zjištění efektivity transfekce a jsme použili kontrolní plazmid CTRL nesoucí fluorescenční protein GFP. Testovali jsme několik kombinací poměru plazmidové DNA a transfekčního činidla (UltraCruz Transfection Reagent). Stanovili jsme, že nejvyšší úspěšnosti transfekce a co nejnižších toxických vlivů transfekčních reagens pro buňky RPTEC/hTERT1 je dosaženo při použití 1  $\mu$ g DNA na reakci.

Dalším krokem bylo stanovení efektivní selekční koncentrace puromycinu. Buňky byly inkubovány s puromycinem v koncentracích 0,5; 1, 2, 3, 4, 6 a 8  $\mu$ g/ml po dobu 5 dnů. Po 5 dnech byla určena nejnižší koncentrace puromycinu, při které nepřežily žádné buňky. Tato koncentrace (6  $\mu$ g/ml) byla použita pro selekci. Komerční systém CRISPR/Cas9 byl použit pro odstranění HDAC6 genu z buněk linie RPTEC/hTERT1. Buňky byly transfekovány 1  $\mu$ g

DNA plazmidu (Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Double Nickase (h) plazmid nebo kontrolního Control Double Nickase plazmid). 24 hodin po transfekci byla ověřena její úspěšnost detekcí exprese proteinu GFP ve fluorescenčním mikroskopu. Poté byly buňky selektovány médiem s puromycinem (6  $\mu\text{g/ml}$ ). Po 5 dnech většina buněk odumřela a zbylé kolonie byly kultivovány po dobu zhruba 1 měsíce. Poté bylo vybráno 12 kolonií, které byly během dalších 3 měsíců rozpěstovány. Takto se nám podařilo získat celkem 6 kolonií a jedna směsná kultura (směs buněk, které zbyly na misce po „vypíchnutí“ kolonií). Úspěšnost delece genu HDAC6 v připravených buňkách byla testována ověřováním výskytu zvýšené hladiny acetylovaného tubulinu metodou Western Blot (obrázek 35). V lyzátu z kolonie 7, 8 a 11 byla detekována vyšší hladina acetylovaného tubulinu oproti WT kontrolním buňkám RPTEC/hTERT1. Tento výsledek naznačuje, že u těchto kolonií došlo k úspěšné deleci genu HDAC6, což bude dále ověřeno pomocí kvantitativní PCR.



**Obrázek 35: Ověření delece genu HDAC6 z linie RPTEC/hTERT1.** Buňky RPTEC/hTERT1 byly transfekovány plazmidem Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Double Nickase (h) plazmid nebo Control Double Nickase plazmid. Buňky 5 dní selektovány v médiu s puromycinem a po 1 měsíci kultivace bylo vybráno 12 monoklonií, které byly další 3 měsíce kultivovány. Získané kolonie byly lyzovány, lyzáty byly separovány na SDS-PAGE a přeneseny na membránu. Specifickými protilátkami byl označen acetylovaný tubulin a GAPDH.

## 6 Diskuse:

Naše laboratoř se dlouhodobě zabývá rolí buněčných proteinů a struktur v životním cyklu polyomavirů. Jednou z takových struktur jsou i mikrotubuly. Ty jsou nepostradatelné nejen pro transport virových částic k buněčnému jádru (Zila et al., 2014), ale hrají roli i v pozdní fázi infekce. Během pozdních fází infekce bylo prokázáno zvýšení acetylace mikrotubulů a jejich přímá interakce s virovým strukturním proteinem VP1 v infikovaných buňkách. Mimo jiné bylo také prokázáno, že interakce virového VP1 s buněčnými mikrotubuly a jejich stabilizace acetylací vede k zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi (Horníková et al., 2017; 2020b). Acetylace mikrotubulů je důležitá i pro replikační cyklus dalších virů, například pro virus chřipky. Virus chřipky typu A (IAV) zvyšuje acetylaci mikrotubulů a využívá tak buněčný cytoskelet k transportu svých virionů. U IAV bylo prokázáno, že deacetylace mikrotubulů prostřednictvím HDAC6, hlavní cytoplazmatické deacetylázy, má negativní vliv na infekci IAV (Husain a Harrod 2011; Husain a Cheung 2014). I přesto, že se účast HDAC6 na zvýšení acetylace mikrotubulů v pozdní fázi infekce MPyV nepotvrdila (Horníková et al., 2020), tak se domníváme, že HDAC6 může průběh infekce MPyV zásadně ovlivnit obdobně jako je tomu u jiných virů (Husain a Harrod 2011; Lazaro et al., 2011; Husain a Cheung 2014; Valera et al., 2015; Chen et al., 2019). Dílčím cílem diplomového projektu tedy bylo určit vliv inhibice buněčného proteinu HDAC6 na průběh infekce myším polyomavirem v buňkách 3T6.

Jako první jsme zvolili cestu inhibice HDAC6 pomocí jejího specifického inhibitoru tubacinu (induktor acetylace tubulinu), který inhibuje funkci HDAC6 přímou vazbou na tento protein, ale nemá vliv na průběh buněčného cyklu (Haggarty et al., 2003). Přidáním tubacinu zároveň s infekcí a v časech 3 a 6 hodin po infekci jsme mohli sledovat vliv HDAC6 na časné kroky polyomavirové infekce. V časně fázi infekce virus vstupuje do buňky, je transportován podél mikrotubulů v časných a pozdních endozómech do hladkého endoplazmatického retikula, kam se dostává zhruba 3 hodiny po infekci. Z ER vstupuje v rozvolněné formě do cytoplazmy, kde se hromadí v blízkosti buněčného jádra, do kterého v čase kolem 6 hpi translokuje. Inhibice HDAC6 pomocí tubacinu vede mimo jiné ke zvýšené acetylaci  $\alpha$ -tubulinu, a tedy k vyšší stabilitě mikrotubulů. Vyšší stabilita mikrotubulů a jejich vyšší acetylace podporuje vazbu molekulárních motorů (Balabanian et al., 2017) a mohla by tak ovlivnit pozitivně, ale i negativně pohyb viru k buněčnému jádru. Tento předpoklad se potvrdil v našich pokusech s tubacinem přidávaným v časných fázích infekce, kdy inhibice HDAC6 vedla ke snížení efektivity

infekce. Obdobné snížení efektivity infekce jako u buněk ošetřených tubacinem jsme navíc pozorovali i u buněk s deletovanou HDAC6 (3T3- $\Delta$ HDAC6), což ukazuje na jasnou závislost infekce MPyV na přítomnosti funkční HDAC6. Při inkubaci buněk s tubacinem zároveň s přidáním viru jsme pozorovali pokles počtu infikovaných buněk závislý na koncentraci tubacinu. Inhibiční potenciál je však závislý nejen na koncentraci tubacinu, ale také na čase jeho přidání. Ačkoliv ve všech časech přidání inhibitoru HDAC6 došlo ke koncentračně závislému snížení infekce, k nejzásadnějšímu snížení infekčnosti došlo v čase přidání inhibitoru 3 hodiny po infekci. V této době by se již virus měl nacházet v endoplazmatickém retikulu (Mannová a Forstová 2003) a zdá se tedy, že snížení infekčnosti není způsobeno inhibicí transportu virionů podél mikrotubulů směrem do ER, ale spíše se jedná o snížení efektivity uvolňování virionů z ER do cytoplazmy v důsledku inhibice HDAC6. Na snížení infekce buněk MPyV se tedy HDAC6 podílí, ale činí tak jinými mechanismy než samotným zvýšením acetylace mikrotubulů.

Jedním z takovýchto mechanismů by mohlo být například omezení tvorby tzv. *foci*, míst v membráně ER, kterými polyomaviry unikají do cytosolu. Tato data jsou však v přímém rozporu s pozorováními u příbuzného viru SV40, kde bylo ukázáno že acetylované mikrotubuly jsou důležité pro tvorbu těchto foci a uvolnění viru z ER. Inhibice HDAC6 a tím pádem i zvýšená acetylace mikrotubulů zvyšuje infekčnost viru SV40 (Ravindran et al., 2017). K tvorbě foci míst jsou však kromě virových proteinů a mikrotubulů důležité také další buněčné proteiny, hlavně chaperony. Funkce chaperonů může být omezena zvýšenou acetylací obdobně jako bylo prokázáno u Hsp90 (Kovacs et al., 2005), přičemž na tvorbě foci by se mohli u různých polyomavirů podílet různé chaperony, jejichž funkce by mohla být acetylací regulována s různou intenzitou. Avšak HDAC6 hraje pravděpodobně roli i v transportu do jádra, neboť k inhibici infekce docházelo i v pozdějších časech přidání inhibitoru. HDAC6 by mohla deacetylovat virové proteiny a napomáhat rozvolnění virionu. Zvýšení acetylace virových strukturních proteinů inhibicí (nebo delecí) HDAC6 by mohlo vést k jejich vlastní stabilizaci, omezení rozvolnění struktury kapsidy a zabránění interakce s ostatními proteiny nutnými pro tvorbu komplexu s importiny. Samotná inhibice tubacinem ovšem nemusí vést k omezení pouze deacetylačních schopností HDAC6, ale zároveň i k omezení ubiquitin-vazebné schopnosti. Molekula tubacinu se totiž přímo váže na HDAC6 a nemusí vést k omezení samotné katalytické funkce HDAC6, ale spíše k blokaci vazebného místa pro substráty.

Roli HDAC6 v časných fázích infekce potvrzuje i pozorování zvýšené efektivity infekce u buněk exprimujících mutantní formy HDAC6. BUZ mutant se záměnou histidinu za alanin ve své ubiquitin vazebné doméně (BUZ) postrádá schopnost vázat ubiquitin, ale nese plně katalyticky funkční domény DD1 a DD2. Naopak CD mutant se záměnou histidinu za alanin v obou katalytických doménách zcela postrádá funkci deacetylační, ale nese plně funkční ubiquitin-vazebnou doménu. Jak v případě buněk exprimujících HDAC6 neschopnou acetylace nebo vazby ubiquitinu jsme pozorovali zvýšení efektivity infekce oproti buňkám exprimujícím plně funkční HDAC6. I přes navzájem odporující si pozorování, kdy nepřítomnost jedné aktivity HDAC6 infektivitu podporuje a delece celé HDAC6 infektivitu inhibuje, se domníváme, že pro časnou fázi infekce je HDAC6 důležitá. Pravděpodobně je nutná koordinace obou aktivit proteinu v jedné nebo více konkrétních událostech během vstupu viru, kde by se pravděpodobně jednalo o exit z ER a vstup viru do jádra, a jejich deregulace může mít jak pozitivní, tak negativní vliv na efektivitu infekce viru.

Inhibice HDAC6 má také vliv na pozdní fázi infekce. Po přidání tubacinu 24 hodin po infekci jsme pozorovali snížení počtu infikovaných buněk. To naznačuje, že k omezení schopnosti viru MPyV replikovat se v buňkách bez funkční HDAC6 nedochází jen v časných fázích infekce, ale také v pozdních fázích, kdy už se virus nachází v jádře a dochází k produkci časných i pozdních antigenů a k replikaci virového genomu. Přítomnost funkční HDAC6 v buňkách pomáhá MPyV k úspěšnému průběhu infekce, a naopak inhibice či úplná absence HDAC6 vede v buňkách k výrazným antivirovým účinkům. Stanovením infekitivity virového potomstva izolovaného z buněk postrádajících HDAC6 se nám podařilo prokázat, že absence HDAC6 v buňkách vede k zásadnímu snížení produkce infekčních virových partikulí. Námi získaná data o infektivitě virového potomstva jsou zároveň v souladu s dříve provedenými pokusy v naší laboratoři, kdy byla studována vyšší míra acetylace virových proteinů způsobená vyřazením deacetylační funkce HDAC6 a bylo zjištěno, že hyperacetylace strukturního virového proteinu VP1 produkovaného v HDAC6-KO buňkách sice vedla k produkci virových částic o stejné velikosti i morfologii jako u WT buněk, ale celkově se projevila nižší infektivita tohoto virového potomstva (Dostálík, 2020, nepublikováno).

Abychom blíže specifikovali účinky HDAC6 na pozdní fázi infekce, analyzovali jsme hladiny časných i pozdních virových proteinů v buňkách s vyřazením genu pro HDAC6. V těchto buňkách dochází ke zvýšení hladiny LT antigenu, a naopak ke snížení množství VP1 v pozdních



fázích infekce. Snížená produkce VP1 je v souladu s faktem, že v buňkách s absencí HDAC6 se produkuje méně infekčních částic. Avšak překvapivým faktem bylo zvýšené množství LT antigenu. Toto zvýšení by mohlo být vysvětleno absencí ubiquitin-vazebné domény HDAC6, která se podílí na degradaci proteinů. V nepřítomnosti HDAC6 tedy logicky může docházet také ke snížení degradace LT antigenu a jeho hromadění v buňce. Je možné, že mezi časnými a pozdními proteiny je rozdíl v tom, která z funkcí HDAC6 je pro ně důležitější. U LT antigenu pravděpodobně může absence HDAC6 hrát roli v jeho hromadění v buňce a snížené degradaci díky absenci ubiquitin vazebné domény. Naopak pro VP1 by se mohlo jednat o vyšší význam deacetylačních domén, kde je nepřítomností HDAC6 narušena stabilita VP1 proteinu právě jeho hyperacetylací. U některých proteinů může totiž přílišná acetylace N-koncových částí proteinů vést k zvýšené vazbě ubiquitin ligáz, tedy enzymů, které označují proteiny určené k proteazomální degradaci a to by mohl být i případ VP1 proteinu (Park et al., 2015). Alternativním vysvětlením poklesu VP1 proteinu v KO-HDAC6 buňkách je pak samotné zvýšení hladiny LT antigenu, které by mohlo vést k deregulaci přepnutí transkripce mezi časnými a pozdními geny a omezení produkce VP1. V dalších částech této práce jsme se tedy zaměřili na specifikaci vlivu jednotlivých funkčních domén HDAC6 na produkci virových proteinů a s tím spojenou produkci nového virového potomstva.

U BUZ mutanty jsme pozorovali výrazné zvýšení exprese jak LT antigenu, tak proteinu VP1. Tato data naznačují, že právě ubiquitin-vazebná funkce HDAC6 má zásadní roli v replikačním cyklu polyomavirů, kdy při neschopnosti vázat ubiquitin a vytvářet agregozómy dochází v buňkách k akumulaci virových proteinů. Zásadní roli BUZ domény podporují i výsledky získané z pokusů s CD mutantou, kde dochází k významně nižším změnám hladin virových proteinů. Hladiny obou virových proteinů byly u CD mutanty nižší, konkrétně u LT antigenu došlo k 30% poklesu oproti kontrole a u VP1 proteinu k 20% poklesu oproti kontrole. V CD mutantních buňkách, kde je plně funkční BUZ doména pravděpodobně dochází k efektivní degradaci virových proteinů zprostředkované právě ubiquitin vazebnou doménou.

Zajímavým výsledkem je pak porovnání infekivity nově produkovaných virových částic z obou typů mutantních buněk. U BUZ i DC buněk sice dochází k poměrně vysokému nárůstu infekčního virového potomstva, konkrétně 6,2x násobnému zvýšení u virionů z BUZ mutantních buněk a 5x násobnému zvýšení u CD mutantních buněk, a ačkoliv by se na první pohled mohlo zvýšení infekivity virového potomstva u CD buněk zdát nelogické, je možné jej

opět vysvětlit roli BUZ domény. Vazba ubiquitinem značených proteinů a jejich následná degradace totiž funguje nejen u špatně složených buněčných proteinů, ale pravděpodobně by obdobně měla fungovat i u virových proteinů. V nepřítomnosti funkční BUZ domény se sice hromadí virové proteiny a produkuje se logicky více virionů, ale tyto viriony a jejich proteiny nemusí být zcela funkční. V buňkách, kde nedochází k regulaci metabolismu špatně složených proteinů, se tyto proteiny hromadí a tím pádem může vznikat i daleko vyšší množství virionů. Avšak infekční viriony mohou představovat jen malé procento z celkového počtu. Tomu by odpovídalo i porovnání s viriony produkoványými v CD mutantních buňkách, které sice vznikly z buněk s menší zásobou virových proteinů, zato ale s funkční regulací proteinového metabolismu pomocí BUZ domény, proto procento infekčních virionů z celkového množství vzniklých virových částic může být daleko vyšší. Proto je do budoucna nutná detailní analýza vztahu mezi infektivitou a množstvím virionů produkováných jednotlivými liniemi.

Cytoplazmatická deacetyláza HDAC6 vykazuje v buňkách širokou řadu funkcí, ať již se jedná o ovlivňování buněčné motility deacetylací buněčného cytoskeletu, zvýšení migrace buněk, regulaci antivirové imunitní odpovědi prostřednictvím vazby RIG-I, či ovlivnění stability a degradace proteinů (Hubbert et al., 2002; Kawaguchi et al., 2003; Liu et al., 2016). Díky této široké škále úloh HDAC6 hraje významnou úlohu nejen v buněčných procesech, ale i v replikačním cyklu obalených RNA virů, jako je virus chřipky typu A či virus získané imunitní nedostatečnosti HIV1 (Lazaro et al., 2011; Husain a Harrod 2011; Husain a Cheung 2014; Valera et al., 2015; Chen et al., 2019).

Tato práce poskytuje prvotní vhled do role HDAC6 v replikačním cyklu malých DNA virů. V této práci se nám podařilo prokázat, že HDAC6 ovlivňuje nejen replikační cyklus RNA virů, ale také replikační cyklus malého neobaleného DNA viru z čeledi *Polyomaviridae*, a sice viru napadajícího hlodavce, myšího polyomaviru MPyV. Díky pilotním datům získaných v této práci můžeme postulovat, že inhibice HDAC6 v buňkách, nebo její úplná absence vede k antivirovým účinkům v infekci MPyV. Nicméně pro úplné pochopení role HDAC6 v replikaci MPyV by bylo vhodné dále studovat a lépe objasnit jak interakce HDAC6 s polyomavirovými proteiny, tak i nepřímé ovlivnění polyomavirového replikačního cyklu regulací buněčných proteinů.

V druhé části diplomového projektu jsme chtěli studovat roli HDAC6 v nádorové transformaci indukované polyomaviry. Připravili jsme dva typy expresních plazmidů – s časnými geny BKPyV, respektive MPyV. Také jsme připravili linii lidských ledvinných buněk RPTEC/hTERT1

s KO-HDAC6. Po detailnější charakterizaci může být tato linie v budoucnu použita jak pro studium buněčné transformace indukované polyomavirem BKPyV tak i pro charakterizaci role HDAC6 v replikačním cyklu BKPyV.

## 7 Závěr:

V rámci diplomového projektu jsme řešili dvě hypotézy týkající se interakce buněčného proteinu HDAC6 s viry čeledi *Polyomaviridae*.

První hypotézu, že HDAC6 reguluje průběh infekce a replikační cyklus polyomavirů se nám podařilo ověřit. Potvrdili jsme, že inhibice/delece HDAC6 negativně ovlivňuje infekci myším polyomavirem a vede k produkci menšího množství infekčního virového potomstva.

**Pomocí objasnění dílčích cílů jsme zjistili, že:**

- inhibice proteinu HDAC6 tubacinem má negativní vliv na infekci buněk polyomaviry jak v časných, tak i pozdních fázích infekce.
- delece genu pro HDAC6 omezuje infekci buněk MPyV.
- na replikační cyklus polyomavirů má významnější vliv ubiquitin-vazebná doména HDAC6 a sní spojená degradace virových proteinů.
- infektivita virových částic získaných z buněk s delecí genu pro HDAC6 je nižší oproti kontrolním buňkám.

**Pro studium druhé hypotézy, že se HDAC6 podílí na nádorové transformaci indukované polyomaviry byly splněny dílčí cíle:**

- Připravit rekombinantní plazmidy exprimující časné proteiny polyomavirů MPyV a BKPyV pro expresi v savčích buňkách.
- Připravit lidskou buněčnou linii s deletovaným genem HDAC6 pomocí systému CRISPR/Cas9.

## 8 Seznam použité literatury:

AN, Ping, Maria Teresa SÁENZ ROBLES a James M. PIPAS, 2012. Large T Antigens of Polyomaviruses: Amazing Molecular Machines. *Annual Review of Microbiology* [online]. **66**(1), 213–236. ISSN 0066-4227, 1545-3251. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-micro-092611-150154

BALABANIAN, Linda, Christopher L. BERGER a Adam G. HENDRICKS, 2017. Acetylated Microtubules Are Preferentially Bundled Leading to Enhanced Kinesin-1 Motility. *Biophysical Journal* [online]. **113**(7), 1551–1560. ISSN 1542-0086. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2017.08.009

BAROUCH, D H a S C HARRISON, 1994. Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *Journal of Virology*. **68**(6), 3982–3989. ISSN 0022-538X.

BECKER, Miriam, Melissa DOMINGUEZ, Lilo GREUNE, Laura SORIA-MARTINEZ, Moritz M. PFLEIDERER, Rachel SCHOWALTER, Christopher B. BUCK, Bärbel S. BLAUM, M. Alexander SCHMIDT a Mario SCHELHAAS, 2019. Infectious Entry of Merkel Cell Polyomavirus. *Journal of Virology* [online]. **93**(6) [vid. 2021-04-18]. ISSN 0022-538X, 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.02004-18

BERTOS, Nicholas R., Benoit GILQUIN, Gordon K. T. CHAN, Tim J. YEN, Saadi KHOCHBIN a Xiang-Jiao YANG, 2004. Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(46), 48246–48254. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M408583200

BOLEN, J B, D G ANDERS, J TREMPY a R A CONSIGLI, 1981. Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: biological functions of the multiple VP1 species. *Journal of Virology*. **37**(1), 80–91. ISSN 0022-538X.

BOYAULT, C, K SADOUL, M PABION a S KHOCHBIN, 2007a. HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene* [online]. **26**(37), 5468–5476. ISSN 0950-9232, 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1210614

BOYAULT, Cyril, Yu ZHANG, Sabrina FRITAH, Cécile CARON, Benoit GILQUIN, So Hee KWON, Carmen GARRIDO, Tso-Pang YAO, Claire VOUREC'H, Patrick MATTHIAS a Saadi KHOCHBIN, 2007b. HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes & Development* [online]. **21**(17), 2172–2181. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.436407

BUCK, Christopher B, Koenraad VAN DOORSLAER, Alberto PERETTI, Eileen M GEOGHEGAN, Michael J TISZA, Ping AN, Joshua P KATZ, James M PIPAS, Alison A MCBRIDE, Alvin C CAMUS, Alexa J MCDERMOTT, Jennifer A DILL, Eric DELWART, Terry F F NG, Kata FARKAS, Charlotte AUSTIN, Simona KRABERGER, William DAVISON, Diana V PASTRANA a Arvind VARSANI, 2016. The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLoS pathogens* [online]. **12**(4), e1005574–e1005574. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1005574

BURTON, K. S. a R. A. CONSIGLI, 1996. Methylation of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virus Research* [online]. **40**(2), 141–147. ISSN 0168-1702. Dostupné z: doi:10.1016/0168-1702(95)01266-4

CALVIGNAC-SPENCER, Sébastien, Mariet C. W. FELTKAMP, Matthew D. DAUGHERTY, Ugo MOENS, Torbjörn RAMQVIST, Reimar JOHNE a Bernhard EHLERS, 2016. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Archives of Virology* [online]. **161**(6), 1739–1750. ISSN 0304-8608, 1432-8798. Dostupné z: doi:10.1007/s00705-016-2794-y

CARMICHAEL, G G, B S SCHAFFHAUSEN, D I DORSKY, D B OLIVER a T L BENJAMIN, 1982. Carboxy terminus of polyoma middle-sized tumor antigen is required for attachment to membranes, associated protein kinase activities, and cell transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **79**(11), 3579–3583. ISSN 0027-8424.

CARMICHAEL, Gordon G., 2016. Gene Regulation and Quality Control in Murine Polyomavirus Infection. *Viruses* [online]. **8**(10) [vid. 2021-04-17]. ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v8100284

CARUSO, Maddalena, Laura BELLONI, Olga STHANDIER, Paolo AMATI a Marie-Isabelle GARCIA, 2003.  $\alpha 4\beta 1$  Integrin Acts as a Cell Receptor for Murine Polyomavirus at the Postattachment Level. *Journal of Virology* [online]. **77**(7), 3913–3921. ISSN 0022-538X, 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.77.7.3913-3921.2003

CRAWFORD, L. V., A. K. ROBBINS a P. M.YR 1974 NICKLIN, 1974. Location of the Origin and Terminus of Replication in Polyoma Virus DNA. *Journal of General Virology* [online]. **25**(1), 133–142. ISSN 1465-2099,. Dostupné z: doi:10.1099/0022-1317-25-1-133

DAILEY, L. a C. BASILICO, 1985. Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression. *Journal of Virology*. **54**(3), 739–749. ISSN 0022-538X, 1098-5514.

DECAPRIO, J. A., J. W. LUDLOW, J. FIGGE, J. Y. SHEW, C. M. HUANG, W. H. LEE, E. MARSILIO, E. PAUCHA a D. M. LIVINGSTON, 1988. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* [online]. **54**(2), 275–283. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(88)90559-4

DECAPRIO, James A., 1999. The Role of the J domain of SV40 Large T in Cellular Transformation. *Biologicals* [online]. **27**(1), 23–28. ISSN 1045-1056. Dostupné z: doi:10.1006/biol.1998.0173

DILL, Jennifer A., Terry F. F. NG a Alvin C. CAMUS, 2016. Complete Sequence of the Smallest Polyomavirus Genome, Giant Guitarfish (<em>Rhynchobatus djiddensis</em>) Polyomavirus 1. *Genome Announcements* [online]. **4**(3), e00391-16. Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.00391-16

DUNANT, N M, M SENFTEN a K BALLMER-HOFER, 1996. Polyomavirus middle-T antigen associates with the kinase domain of Src-related tyrosine kinases. *Journal of Virology*. **70**(3), 1323–1330. ISSN 0022-538X.

DOSTALÍK, Pavel. *Role acetylace proteinů v životním cyklu Polyomavirů*. Praha, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Vedoucí práce Horníková, Lenka.

EASH, Sylvia a Walter J. ATWOOD, 2005. Involvement of Cytoskeletal Components in BK Virus Infectious Entry. *Journal of Virology* [online]. **79**(18), 11734–11741. ISSN 0022-538X, 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.79.18.11734-11741.2005

FARMERIE, W. G. a W. R. FOLK, 1984. Regulation of polyomavirus transcription by large tumor antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **81**(22), 6919–6923. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.81.22.6919

FEIGENBAUM, L., S. H. HINRICHS a G. JAY, 1992. JC virus and simian virus 40 enhancers and transforming proteins: role in determining tissue specificity and pathogenicity in transgenic mice. *Journal of Virology*. **66**(2), 1176–1182. ISSN 0022-538X, 1098-5514.

FENG, Huichen, Masahiro SHUDA, Yuan CHANG a Patrick S MOORE, 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2008/01/17 vyd. **319**(5866), 1096–1100. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1152586

FLUCK, Michele M. a Brian S. SCHAFFHAUSEN, 2009. Lessons in Signaling and Tumorigenesis from Polyomavirus Middle T Antigen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* [online]. **73**(3), 542–563. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00009-09

FORSTOVÁ, J, N KRAUZEWICZ, S WALLACE, A J STREET, S M DILWORTH, S BEARD a B E GRIFFIN, 1993. Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *Journal of Virology*. **67**(3), 1405–1413. ISSN 0022-538X.

FREUND, R, C J DAWE a T L BENJAMIN, 1988. Duplication of noncoding sequences in polyomavirus specifically augments the development of thymic tumors in mice. *Journal of Virology*. **62**(10), 3896–3899. ISSN 0022-538X.

GARDNER, SylviaD., AnneM. FIELD, DulcieV. COLEMAN a B. HULME, 1971. NEW HUMAN PAPOVAVIRUS (B.K.) ISOLATED FROM URINE AFTER RENAL TRANSPLANTATION. *The Lancet* [online]. **297**(7712), 1253–1257. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(71)91776-4

GIANNECCHINI, Simone, 2020. Evidence of the Mechanism by Which Polyomaviruses Exploit the Extracellular Vesicle Delivery System during Infection. *Viruses* [online]. **12**, 585. Dostupné z: doi:10.3390/v12060585

GILBERT, Joanna M., Ilya G. GOLDBERG a Thomas L. BENJAMIN, 2003. Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *Journal of Virology* [online]. **77**(4), 2615–2622. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/jvi.77.4.2615-2622.2003

GOETZ, G. S., F. B. DEAN, J. HURWITZ a S. W. MATSON, 1988. The unwinding of duplex regions in DNA by the simian virus 40 large tumor antigen-associated DNA helicase activity. *Journal of*

*Biological Chemistry* [online]. **263**(1), 383–392. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)57404-X

GOSERT, Rainer, Christine H. RINALDO, Georg A. FUNK, Adrian EGLI, Emilio RAMOS, Cinthia B. DRACHENBERG a Hans H. HIRSCH, 2008. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. **205**(4), 841–852. ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20072097

GROSS, Ludwik, 1953. A Filterable Agent, Recovered from Ak Leukemic Extracts, Causing Salivary Gland Carcinomas in C3H Mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* [online]. **83**(2), 414–421. Dostupné z: doi:10.3181/00379727-83-20376

GROZINGER, Christina M., Christian A. HASSIG a Stuart L. SCHREIBER, 1999. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96**(9), 4868–4873. ISSN 0027-8424.

HAGGARTY, S. J., K. M. KOELLER, J. C. WONG, C. M. GROZINGER a S. L. SCHREIBER, 2003. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **100**(8), 4389–4394. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0430973100

HOOK, Sara S., Amir ORIAN, Shaun M. COWLEY a Robert N. EISENMAN, 2002. Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **99**(21), 13425–13430. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.172511699

HORNÍKOVÁ, Lenka, Kateřina BRUŠTÍKOVÁ a Jitka FORSTOVÁ, 2020a. Microtubules in Polyomavirus Infection. *Viruses* [online]. **12**(1) [vid. 2021-04-12]. ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v12010121

HORNÍKOVÁ, Lenka, Kateřina BRUŠTÍKOVÁ, Boris RYABCHENKO, Ilia ZHERNOV, Martin FRAIBERK, Zuzana MARINIČOVÁ, Zdeněk LÁNSKÝ a Jitka FORSTOVÁ, 2020b. The Major Capsid Protein, VP1, of the Mouse Polyomavirus Stimulates the Activity of Tubulin Acetyltransferase 1 by Microtubule Stabilization. *Viruses* [online]. **12**(2) [vid. 2021-04-12]. ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v12020227

HORNÍKOVÁ, Lenka, Martin FRAIBERK, Petr MAN, Václav JANOVEC a Jitka FORSTOVÁ, 2017. VP1, the major capsid protein of the mouse polyomavirus, binds microtubules, promotes their acetylation and blocks the host cell cycle. *The FEBS Journal* [online]. **284**(2), 301–323. ISSN 1742-4658. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/febs.13977

HORNÍKOVÁ, Lenka, Vojtěch ŽÍLA, Hana ŠPANIELOVÁ a Jitka FORSTOVÁ, 2015. Mouse Polyomavirus: Propagation, Purification, Quantification, and Storage. *Current Protocols in Microbiology* [online]. **38**(1), 14F.1.1-14F.1.26. ISSN 1934-8533. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc14f01s38



HUBBERT, Charlotte, Amaris GUARDIOLA, Rong SHAO, Yoshiharu KAWAGUCHI, Akihiro ITO, Andrew NIXON, Minoru YOSHIDA, Xiao-Fan WANG a Tso-Pang YAO, 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* [online]. **417**(6887), 455–458. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/417455a

HUO, Lihong, Dengwen LI, Xiaouu SUN, Xingjuan SHI, Prasanthi KARNA, Wei YANG, Min LIU, Wentao QIAO, Ritu ANEJA a Jun ZHOU, 2011. Regulation of Tat Acetylation and Transactivation Activity by the Microtubule-associated Deacetylase HDAC6. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **286**(11), 9280–9286. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.208884

HUSAIN, Matloob a Kevin S. HARROD, 2011. Enhanced acetylation of alpha-tubulin in influenza A virus infected epithelial cells. *FEBS letters* [online]. **585**(1), 128–132. ISSN 1873-3468. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2010.11.023

HUSAIN, Matloob a Chen-Yi CHEUNG, 2014. Histone Deacetylase 6 Inhibits Influenza A Virus Release by Downregulating the Trafficking of Viral Components to the Plasma Membrane via Its Substrate, Acetylated Microtubules. *Journal of Virology* [online]. **88**(19), 11229–11239. ISSN 0022-538X, 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00727-14

CHANG, Yuan a Patrick S MOORE, 2012. Merkel cell carcinoma: a virus-induced human cancer. *Annual review of pathology* [online]. 2011/09/13 vyd. **7**, 123–144. ISSN 1553-4014. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130227

CHELLAPPAN, S, V B KRAUS, B KROGER, K MUNGER, P M HOWLEY, W C PHELPS a J R NEVINS, 1992. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**(10), 4549–4553. ISSN 0027-8424.

CHEN, Huan, Yingjuan QIAN, Xin CHEN, Zhiyang RUAN, Yuetian YE, Hongjun CHEN, Lorne A. BABIUK, Yong-Sam JUNG a Jianjun DAI, 2019. HDAC6 Restricts Influenza A Virus by Deacetylation of the RNA Polymerase PA Subunit. *Journal of Virology* [online]. **93**(4) [vid. 2021-04-20]. ISSN 0022-538X, 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.01896-18

CHOI, Su Jin, Hyun-Cheol LEE, Jae-Hoon KIM, Song Yi PARK, Tae-Hwan KIM, Woon-Kyu LEE, Duk-Jae JANG, Ji-Eun YOON, Young-Il CHOI, Seihwan KIM, JinYeul MA, Chul-Joong KIM, Tso-Pang YAO, Jae U JUNG, Joo-Yong LEE a Jong-Soo LEE, 2016. HDAC6 regulates cellular viral RNA sensing by deacetylation of RIG-I. *The EMBO Journal* [online]. **35**(4), 429–442. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.15252/embj.201592586

KAWAGUCHI, Yoshiharu, Jeffrey J KOVACS, Adam MCLAURIN, Jeffery M VANCE, Akihiro ITO a Tso-Pang YAO, 2003. The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress. *Cell* [online]. **115**(6), 727–738. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(03)00939-5

KHALILI, Kamel, Ilker Kudret SARIYER a Mahmut SAFAK, 2008. Small Tumor Antigen of Polyomaviruses: Role in Viral Life Cycle and Cell Transformation. *Journal of cellular physiology* [online]. **215**(2), 309–319. ISSN 0021-9541. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.21326

KOVACS, Jeffrey J., Patrick J. M. MURPHY, Stéphanie GAILLARD, Xuan ZHAO, June-Tai WU, Christopher V. NICCHITTA, Minoru YOSHIDA, David O. TOFT, William B. PRATT a Tso-Pang YAO, 2005. HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Molecular Cell* [online]. **18**(5), 601–607. ISSN 1097-2765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2005.04.021

LANE, D. P. a L. V. CRAWFORD, 1979. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature* [online]. **278**(5701), 261–263. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/278261a0

LAZARO, Estibaliz, Carl KADIE, Pamela STAMEGNA, Shao Chong ZHANG, Pauline GOURDAIN, Nicole Y. LAI, Mei ZHANG, Sergio A. MARTINEZ, David HECKERMAN a Sylvie Le GALL, 2011. Variable HIV peptide stability in human cytosol is critical to epitope presentation and immune escape. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. **121**(6), 2480–2492. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI44932

LEDNICKY, John A., Amy S. ARRINGTON, A. Renee STEWART, Xian Min DAI, Connie WONG, Sanjeeda JAFAR, Michael MURPHEY-CORB a Janet S. BUTEL, 1998. Natural Isolates of Simian Virus 40 from Immunocompromised Monkeys Display Extensive Genetic Heterogeneity: New Implications for Polyomavirus Disease. *Journal of Virology*. **72**(5), 3980–3990. ISSN 0022-538X.

LI, Congying, Lu CAO, Cong XU, Fang LIU, Guomin XIANG, Xiaozhen LIU, Jiao JIAO a Yun NIU, 2018. The immunohistochemical expression and potential prognostic value of HDAC6 and AR in invasive breast cancer. *Human Pathology* [online]. **75**, 16–25. ISSN 1532-8392. Dostupné z: doi:10.1016/j.humpath.2017.11.010

LI, M., M. K. LYON a R. L. GARCEA, 1995. In vitro phosphorylation of the polyomavirus major capsid protein VP1 on serine 66 by casein kinase II. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **270**(43), 26006–26011. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.43.26006

LI, Yu, Xiaowu ZHANG, Roberto D. POLAKIEWICZ, Tso-Pang YAO a Michael J. COMB, 2008. HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(19), 12686–12690. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C700185200

LIEBL, David, Francesco DIFATO, Lenka HORNÍKOVÁ, Petra MANNOVÁ, Jitka ŠTOKROVÁ a Jitka FORSTOVÁ, 2006. Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes, Requires Their Acidic pH for Productive Infection, and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes. *Journal of Virology* [online]. **80**(9), 4610–4622. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.80.9.4610-4622.2006

LIU, Helene Minyi, Fuguo JIANG, Yueh Ming LOO, ShuZhen HSU, Tien-Ying HSIANG, Joseph MARCOTRIGIANO a Michael GALE, 2016. Regulation of Retinoic Acid Inducible Gene-I (RIG-I) Activation by the Histone Deacetylase 6. *EBioMedicine* [online]. **9**, 195–206. ISSN 2352-3964. Dostupné z: doi:10.1016/j.ebiom.2016.06.015

LIU, Z a G G CARMICHAEL, 1993. Polyoma virus early-late switch: regulation of late RNA accumulation by DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **90**(18), 8494–8498. ISSN 0027-8424.

LOSSON, Hélène, Michael SCHNEKENBURGER, Mario DICATO a Marc DIEDERICH, 2020. HDAC6—An Emerging Target Against Chronic Myeloid Leukemia? *Cancers* [online]. **12**(2) [vid. 2021-04-20]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12020318

LOW, Jonathan A., Brian MAGNUSON, Billy TSAI a Michael J. IMPERIALE, 2006. Identification of Gangliosides GD1b and GT1b as Receptors for BK Virus. *Journal of Virology* [online]. **80**(3), 1361–1366. ISSN 0022-538X, 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.80.3.1361-1366.2006

LUDLOW, J. W. a R. A. CONSIGLI, 1987. Polyomavirus major capsid protein VP1 is modified by tyrosine sulfuration. *Journal of Virology* [online]. **61**(5), 1708–1711. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.61.5.1708-1711.1987

LUDLOW, J. W. a R. A. CONSIGLI, 1989. Hydroxyproline in the major capsid protein VP1 of polyomavirus. *Journal of Virology* [online]. **63**(6), 2881–2884. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.63.6.2881-2884.1989

LUDLOW, John W., John SHON, James M. PIPAS, David M. LIVINGSTON a James A. DECAPRIO, 1990. The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell* [online]. **60**(3), 387–396. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(90)90590-B

MANNOVÁ, Petra a Jitka FORSTOVÁ, 2003. Mouse Polyomavirus Utilizes Recycling Endosomes for a Traffic Pathway Independent of COPI Vesicle Transport. *Journal of Virology* [online]. **77**(3), 1672–1681. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.77.3.1672-1681.2003

MATSUYAMA, Akihisa, Tadahiro SHIMAZU, Yuko SUMIDA, Akiko SAITO, Yasuhiro YOSHIMATSU, Daphné SEIGNEURIN-BERNY, Hiroyuki OSADA, Yasuhiko KOMATSU, Norikazu NISHINO, Saadi KHOCHBIN, Sueharu HORINOUCI a Minoru YOSHIDA, 2002. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO Journal* [online]. **21**(24), 6820–6831. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdf682

MOENS, Ugo, Sébastien CALVIGNAC-SPENCER, Chris LAUBER, Torbjörn RAMQVIST, Mariet C. W. FELTKAMP, Matthew D. DAUGHERTY, Ernst J. VERSCHOOR, Bernhard EHLERS, a ICTV REPORT CONSORTIUM, 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *Journal of General Virology* [online]. **98**(6), 1159–1160. ISSN 0022-1317, 1465-2099. Dostupné z: doi:10.1099/jgv.0.000839

MOENS, Ugo, Carla PREZIOSO a Valeria PIETROPAOLO, 2020. Genetic Diversity of the Noncoding Control Region of the Novel Human Polyomaviruses. *Viruses* [online]. **12**(12) [vid. 2021-04-16]. ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v12121406

MORAN, Elizabeth, 1988. A region of SV40 large T antigen can substitute for a transforming domain of the adenovirus E1A products. *Nature* [online]. **334**(6178), 168–170. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/334168a0

PADGETT, Billiel, GabrieleM ZURHEIN, DuardL WALKER, RobertJ ECKROADE a Berth DESSEL, 1971. CULTIVATION OF PAPOVA-LIKE VIRUS FROM HUMAN BRAIN WITH PROGRESSIVE MULTIFOCAL LEUCOENCEPHALOPATHY. *The Lancet* [online]. **297**(7712), 1257–1260. ISSN 0140-6736, 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(71)91777-6

PALLAS, D. C., L. K. SHAHRIK, B. L. MARTIN, S. JASPERS, T. B. MILLER, D. L. BRAUTIGAN a T. M. ROBERTS, 1990. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* [online]. **60**(1), 167–176. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(90)90726-u

PARK, Sang-Eun, Jeong-Mok KIM, Ok-Hee SEOK, Hanna CHO, Brandon WADAS, Seon-Young KIM, Alexander VARSHAVSKY a Cheol-Sang HWANG, 2015. Control of mammalian G protein signaling by N-terminal acetylation and the N-end rule pathway. *Science* [online]. **347**(6227), 1249–1252. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.aaa3844

PEDEN, K. W., S. L. SPENCE, L. C. TACK, C. A. CARTWRIGHT, A. SRINIVASAN a J. M. PIPAS, 1990. A DNA replication-positive mutant of simian virus 40 that is defective for transformation and the production of infectious virions. *Journal of Virology*. **64**(6), 2912–2921. ISSN 0022-538X, 1098-5514.

PELKMAN, L., J. KARTENBECK a A. HELENIUS, 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology* [online]. **3**(5), 473–483. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/35074539

PERETTI, Alberto, Peter C. FITZGERALD, Valery BLISKOVSKY, Diana V. PASTRANA a Christopher B. BUCK, 2015. Genome Sequence of a Fish-Associated Polyomavirus, Black Sea Bass (*Centropristis striata*) Polyomavirus 1. *Genome Announcements* [online]. **3**(1), e01476-14, /ga/3/1/e01476-14.atom. ISSN 2169-8287. Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.01476-14

PHO, M. T., A. ASHOK a Walter J. ATWOOD, 2000. JC Virus Enters Human Glial Cells by Clathrin-Dependent Receptor-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology*. **74**(5), 2288–2292. ISSN 0022-538X.

POWELL, Andrew J., Alison J. DARMON, Efsthios S. GONOS, Eric W.-F. LAM, Keith WC PEDEN a Parmjit S. JAT, 1999. Different functions are required for initiation and maintenance of immortalization of rat embryo fibroblasts by SV40 large T antigen. *Oncogene* [online]. **18**(51), 7343–7350. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1203154

PRINGLE, C. R., 1999. Virus Taxonomy – 1999: The Universal System of Virus Taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Archives of Virology* [online]. **144**(2), 421–429. ISSN 0304-8608, 1432-8798. Dostupné z: doi:10.1007/s007050050515

RAVINDRAN, Madhu Sudhan, Martin F. ENGELKE, Kristen J. VERHEY a Billy TSAI, 2017. Exploiting the kinesin-1 molecular motor to generate a virus membrane penetration site. *Nature Communications* [online]. **8**, 15496. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms15496

RAVINDRAN, Madhu Sudhan, Chelsey C. SPRIGGS, Kristen J. VERHEY a Billy TSAI, 2018. Dynein Engages and Disassembles Cytosol-Localized Simian Virus 40 To Promote Infection. *Journal of Virology* [online]. **92**(12), e00353-18. ISSN 0022-538X, 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00353-18

RICHTEROVÁ, Zuzana, David LIEBL, Martin HORÁK, Zdena PALKOVÁ, Jitka ŠTOKROVÁ, Pavel HOZÁK, Jan KORB a Jitka FORSTOVÁ, 2001. Caveolae Are Involved in the Trafficking of Mouse Polyomavirus Virions and Artificial VP1 Pseudocapsids toward Cell Nuclei. *Journal of Virology* [online]. **75**(22), 10880–10891. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.75.22.10880-10891.2001

ROCHFORD, R, B A CAMPBELL a L P VILLARREAL, 1990. Genetic analysis of the enhancer requirements for polyomavirus DNA replication in mice. *Journal of Virology*. **64**(2), 476–485. ISSN 0022-538X.

ROCHFORD, R, J P MORENO, M L PEAKE a L P VILLARREAL, 1992. Enhancer dependence of polyomavirus persistence in mouse kidneys. *Journal of Virology*. **66**(6), 3287–3297. ISSN 0022-538X.

RUBINSTEIN, R., N. PARE a E. H. HARLEY, 1987. Structure and function of the transcriptional control region of nonpassaged BK virus. *Journal of Virology*. **61**(5), 1747–1750. ISSN 0022-538X, 1098-5514.

SAKUMA, Takumi, Katsuhiko UZAWA, Takeshi ONDA, Masashi SHIIBA, Hidetaka YOKOE, Takahiko SHIBAHARA a Hideki TANZAWA, 2006. Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* [online]. **29**(1), 117–124. ISSN 1019-6439. Dostupné z: doi:10.3892/ijo.29.1.117

SEIDEL, Carole, Michael SCHNEKENBURGER, Mario DICATO a Marc DIEDERICH, 2015. Histone deacetylase 6 in health and disease. *Epigenomics* [online]. **7**(1), 103–118. ISSN 1750-1911, 1750-192X. Dostupné z: doi:10.2217/epi.14.69

SEIGNEURIN-BERNY, Daphné, André VERDEL, Sandrine CURTET, Claudie LEMERCIER, Jérôme GARIN, Sophie ROUSSEAUX a Saadi KHOCHBIN, 2001. Identification of Components of the Murine Histone Deacetylase 6 Complex: Link between Acetylation and Ubiquitination Signaling Pathways. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **21**(23), 8035–8044. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.21.23.8035-8044.2001

SKULTETYOVA, Lubica, Kseniya USTINOVA, Zsafia KUTIL, Zora NOVAKOVA, Jiri PAVLICEK, Jana MIKESOVA, Dalibor TRAPL, Petra BARANOVA, Barbora HAVLINOVA, Martin HUBALEK, Zdenek LANSKY a Cyril BARINKA, 2017. Human histone deacetylase 6 shows strong preference for tubulin dimers over assembled microtubules. *Scientific Reports* [online]. **7** [vid. 2021-04-12]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-11739-3

SOLDATOVA, Irina, Terezie PRILEPSKAJA, Levon ABRAHAMYAN, Jitka FORSTOVÁ a Sandra HUÉRFANO, 2018. Interaction of the Mouse Polyomavirus Capsid Proteins with Importins Is Required for Efficient Import of Viral DNA into the Cell Nucleus. *Viruses* [online]. **10**(4) [vid. 2021-04-16]. ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v10040165

SRINIVASAN, A., A. J. MCCLELLAN, J. VARTIKAR, I. MARKS, P. CANTALUPO, Y. LI, P. WHYTE, K. RUNDELL, J. L. BRODSKY a J. M. PIPAS, 1997. The amino-terminal transforming region of simian virus 40 large T and small t antigens functions as a J domain. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **17**(8), 4761–4773. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/mcb.17.8.4761

SROLLER, Vojtech, Regis A. VILCHEZ, A. Renee STEWART, Connie WONG a Janet S. BUTEL, 2008. Influence of the Viral Regulatory Region on Tumor Induction by Simian Virus 40 in Hamsters. *Journal of Virology* [online]. **82**(2), 871–879. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.01626-07

SWEET, B. H. a M. R. HILLEMANN, 1960. The Vacuolating Virus, S.V.40. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* [online]. **105**(2), 420–427. ISSN 0037-9727. Dostupné z: doi:10.3181/00379727-105-26128

TREISMAN, R., U. NOVAK, J. FAVALORO a R. KAMEN, 1981. Transformation of rat cells by an altered polyoma virus genome expressing only the middle-T protein. *Nature* [online]. **292**(5824), 595–600. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/292595a0

TSAL, Billy, Joanna M. GILBERT, Thilo STEHLE, Wayne LENCER, Thomas L. BENJAMIN a Tom A. RAPOPORT, 2003. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *The EMBO Journal* [online]. **22**(17), 4346–4355. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdg439

VALENZUELA-FERNÁNDEZ, Agustín, Susana ÁLVAREZ, Mónica GORDON-ALONSO, Marta BARRERO, Ángeles URSA, J. Román CABRERO, Gerónimo FERNÁNDEZ, Salvador NARANJO-SUÁREZ, María YÁÑEZ-MO, Juan M. SERRADOR, M. Ángeles MUÑOZ-FERNÁNDEZ a Francisco SÁNCHEZ-MADRID, 2005. Histone Deacetylase 6 Regulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Molecular Biology of the Cell* [online]. **16**(11), 5445–5454. ISSN 1059-1524, 1939-4586. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.e05-04-0354

VALERA, María-Soledad, Laura DE ARMAS-RILLO, Jonathan BARROSO-GONZÁLEZ, Serena ZIGLIO, Julien BATISSE, Noé DUBOIS, Sara MARRERO-HERNÁNDEZ, Sophie BOREL, Laura GARCÍA-EXPÓSITO, Martine BIARD-PIECHACZYK, Jean-Christophe PAILLART a Agustín VALENZUELA-FERNÁNDEZ, 2015. The HDAC6/APOBEC3G complex regulates HIV-1 infectiveness by inducing Vif autophagic degradation. *Retrovirology* [online]. **12**(1), 53. ISSN 1742-4690. Dostupné z: doi:10.1186/s12977-015-0181-5

VAN REGENMORTEL, Marc HV, Claude M. FAUQUET, David HL BISHOP, E. B. CARSTENS, M. K. ESTES, S. M. LEMON, J. MANILOFF, M. A. MAYO, D. J. MCGEOCH a C. R. PRINGLE, 2000. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. B.m.: Academic Press.

VERDEL, André, Sandrine CURTET, Marie-Paule BROCARD, Sophie ROUSSEAU, Claudie LEMERCIER, Minoru YOSHIDA a Saadi KHOCHBIN, 2000. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Current Biology* [online]. **10**(12), 747–749. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-9822(00)00542-X

VERDEL, André a Saadi KHOCHBIN, 1999. Identification of a New Family of Higher Eukaryotic Histone Deacetylases: COORDINATE EXPRESSION OF DIFFERENTIATION-DEPENDENT CHROMATIN MODIFIERS \*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **274**(4), 2440–2445. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.4.2440

WANG, E. H. a C. PRIVES, 1991. DNA helicase and duplex DNA fragment unwinding activities of polyoma and simian virus 40 large T antigen display similarities and differences. *The Journal of Biological Chemistry*. **266**(19), 12668–12675. ISSN 0021-9258.

WHITE, Martyn K., Mahmut SAFAK a Kamel KHALILI, 2009. Regulation of Gene Expression in Primate Polyomaviruses. *Journal of Virology* [online]. **83**(21), 10846–10856. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00542-09

YACIUK, P., M. C. CARTER, J. M. PIPAS a E. MORAN, 1991. Simian virus 40 large-T antigen expresses a biological activity complementary to the p300-associated transforming function of the adenovirus E1A gene products. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **11**(4), 2116–2124. ISSN 0270-7306, 1098-5549. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.11.4.2116

YU, Yongjun, Sagar B. KUDCHODKAR a James C. ALWINE, 2005. Effects of simian virus 40 large and small tumor antigens on mammalian target of rapamycin signaling: small tumor antigen mediates hypophosphorylation of eIF4E-binding protein 1 late in infection. *Journal of Virology* [online]. **79**(11), 6882–6889. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.79.11.6882-6889.2005

ZHANG, Xiaohong, Zhigang YUAN, Yingtao ZHANG, Sarah YONG, Alexis SALAS-BURGOS, John KOOMEN, Nancy OLASHAW, J. Thomas PARSONS, Xiang-Jiao YANG, Sharon R. DENT, Tso-Pang YAO, William S. LANE a Edward SETO, 2007. HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Molecular Cell* [online]. **27**(2), 197–213. ISSN 1097-2765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2007.05.033

ZHANG, Yu, Benoit GILQUIN, Saadi KHOCHBIN a Patrick MATTHIAS, 2006. Two catalytic domains are required for protein deacetylation. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **281**(5), 2401–2404. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C500241200

ZHANG, Yu, Na LI, Cécile CARON, Gabriele MATTHIAS, Daniel HESS, Saadi KHOCHBIN a Patrick MATTHIAS, 2003. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *The EMBO journal* [online]. **22**(5), 1168–1179. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdg115

ZHENG, Kai, Yingchun JIANG, Zhendan HE, Kaio KITAZATO a YifeiYR 2017 WANG, 2017. Cellular defence or viral assist: the dilemma of HDAC6. *Journal of General Virology* [online]. **98**(3), 322–337. ISSN 1465-2099,. Dostupné z: doi:10.1099/jgv.0.000679

ZHU, J. Y., M. ABATE, P. W. RICE a C. N. COLE, 1991. The ability of simian virus 40 large T antigen to immortalize primary mouse embryo fibroblasts cosegregates with its ability to bind to p53. *Journal of Virology*. **65**(12), 6872–6880. ISSN 0022-538X, 1098-5514.

ZHU, Jianzhong, Carolyn B COYNE a Saumendra N SARKAR, 2011. PKC alpha regulates Sendai virus-mediated interferon induction through HDAC6 and  $\beta$ -catenin. *The EMBO Journal* [online]. **30**(23), 4838–4849. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1038/emboj.2011.351

ZILA, Vojtech, Francesco DIFATO, Lucie KLIMOVA, Sandra HUERFANO a Jitka FORSTOVA, 2014. Involvement of Microtubular Network and Its Motors in Productive Endocytic Trafficking of Mouse Polyomavirus. *PLOS ONE* [online]. **9**(5), e96922. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0096922

ZOU, Hua, Yiqin WU, Marc NAVRE a Bi-Ching SANG, 2006. Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **341**(1), 45–50. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.144